

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 515**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2007 E 07763740 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2051996**

54 Título: **Método para modificar receptores de células T**

30 Prioridad:

05.07.2006 AT 11462006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2015

73 Titular/es:

**F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG-
UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H (100.0%)
Schwarzenbergplatz 7
1030 Vienna , AT**

72 Inventor/es:

**HIMMLER, GOTTFRIED y
RÜKER, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 515 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

Método para modificar receptores de células T

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método nuevo para modificar genéticamente los receptores de células T y los polipéptidos del dominio del receptor de células T con el objetivo de dotarlos de propiedades específicas de unión. Además, se desvelan polipéptidos del dominio del receptor de células T obtenidos por dicho método y su utilización para establecer bibliotecas y desarrollar métodos de detección y selección de posibles estructuras de unión.

Antecedentes

Los receptores de las células T (TCR) son moléculas importantes del sistema inmunitario. Sus dominios extracelulares son homólogos con y estructuralmente similares a un fragmento Fab de anticuerpo.

Los receptores de células T se expresan de modo natural en la superficie de las células T normalmente como integrantes heterodiméricos alfa/beta y gama/delta de las proteínas de membrana, cada subunidad comprende un segmento corto intracelular, una hélice alfa única transmembranosa y dos dominios globulares extracelulares de la superfamilia Ig. El heterodímero TCR se estabiliza por un enlace disulfuro intercatenario extracelular, membranario proximal (Immunobiology. 5ª ed. Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. New York and London: Garland Publishing; 2001).

Los TCR por lo tanto tienen cuatro dominios extracelulares, los dos dominios membranarios proximales (extremo C), que son constantes, y los dos dominios del extremo N que son variables. Los dominios variables están codificados por segmentos genéticos variables que se reordenan con segmentos de unión y constantes (y segmentos genéticos de diversidad en el caso de cadenas β) para producir la diversidad de TCR que se observa en el sistema inmunitario maduro.

Tanto los dominios variables como los dominios constantes de los receptores de células T son estructuralmente similares a los dominios de anticuerpo y muestran el típico "plegamiento de inmunoglobulinas".

Cada dominio tiene una estructura similar de las dos láminas beta incluidas apretadamente una con otra en un barril beta antiparalelo comprimido.

El plegamiento de inmunoglobulina de los dominios constantes de TCR (dominios C) contiene una lámina de 3 cadenas incluida con una lámina de 4 cadenas. El plegamiento se estabiliza por enlaces de hidrógeno entre las cadenas beta de cada lámina, por enlace hidrofóbico entre los restos de láminas opuestas en el interior, y por un enlace disulfuro entre las láminas. Las cadenas con 3 cadenas se designan C, F y G, y la lámina de 4 cadenas comprende las cadenas A, B, D y E. Las letras de A a G denotan posiciones secuenciales de las cadenas beta a lo largo de la secuencia de aminoácidos del pliegue de inmunoglobulina.

El pliegue de los dominios variables (dominios V) tiene 9 cadenas beta dispuestas en dos láminas de 4 y 5 cadenas. La lámina de 5 cadenas es estructuralmente homóloga a la lámina de 3 cadenas de los dominios constantes, pero contiene las cadenas extras C' y C''. El resto de cadenas (A, B, C, D, E, F, G) tienen la misma topología y estructura similar que sus equivalentes de los plegamientos de inmunoglobulina del dominio constante.

Un enlace disulfuro une las cadenas B y F en láminas opuestas, como en los dominios constantes.

Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos y la designación de los bucles proteicos y láminas de los TCR son de acuerdo con el esquema de numeración IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc et al., (2003) Dev Comp Immunol 27:55-77.; Lefranc et al. (2005) Dev Comp Immunol 29:185-203).

Los dominios variables de ambas cadenas de TCR contienen tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son bucles que conectan cadenas beta B-C, C'-C'', y F-G del plegamiento de inmunoglobulina. Los restos en las CDR varían de una molécula de TCR a la siguiente, dotando cada TCR de especificidad antigénica.

Los dominios V y la inclinación de las moléculas TCR están empaquetadas estrechamente tal que las 6 CDR (3 del dominio variable) cooperan en la construcción de una superficie (o cavidad) para la unión específica al antígeno. El sitio de unión al antígeno natural de un TCR está compuesto por los bucles que conectan las cadenas B-C, C'-C'', y F-G del dominio variable de cadena ligera y las cadenas B-C, C'-C'', y F-G del dominio variable de cadena pesada. La extensión de la contribución específica para la unión al antígeno de los seis bucles de CDR pueden variar entre TCR diferentes.

Se ha demostrado que los receptores de células T tienen un potencial terapéutico y diagnóstico y se pueden modificar de forma similar que las moléculas de anticuerpo (por ejemplo, Molloy et al. *Curr Opin Pharmacol.* (2005) 5:438-443; Boulter & Jakobsen (2005) *Clin Exp Immunol.* 142:454-460; Simon et al (1992) *Protein Engineerings* 5: 229-234).

5 Se demostrado la clonación y expresión de receptores solubles y anclados a células T en varios formatos (por ejemplo, Moysey et al. (2004) *Anal Biochem.* 326:284-286; Wulfing & Plueckthun (1994) *J Mol Biol.*242:655-669; Boulter et al. (2003) *Protein Eng.* 16:707-711; Schodin et al. (1996) *Mol Immunol* 33:819 829; Chung et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12654 12658; Plaksin et al. (1997) *J Immunol* 158:2218 2227; Willcox et al. (1999) *Protein Sci* 8:2418 2423; Weber et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:19033-19038; WO04050705A2; WO9618105A1; WO04033685A1; WO02066636A2). El documento WO02059263C2 describe animales transgénicos que comprenden un sistema inmunitario humanizado para desarrollar moléculas TCR humanas.

15 Se ha demostrado la generación de uniones de alta afinidad y se han seguido de forma similar a las tecnologías de maduración de afinidad de anticuerpos (por ejemplo, Boulter et al. *Nat Biotechnol.* (2005) 23:349-354; Chlewicki et al. (2005) *J Mol Biol.* 346:223-239;

Laugel et al. *J.Biol. Chemistry* 280(3) 1882-1892 (2005); Monza et al. *PNAS* 103(26)9867-9872 (2006);

20 Shusta et al. (2000) 18:754-759; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5387 92). Los documentos WO04044004A2, WO05116646A1 y WO9839482A1 describen ribosomas y fagos de presentación de cadenas de TCR y métodos para seleccionar moléculas TCR contra antígenos específicos. El documento WO0148145A2 describe los TCR de alta afinidad. La modificación de los dominios variables extracelulares de los receptores de células T se han caracterizado con el fin de modificación de la especificidad por medio de la modificación de las regiones CDR (documentos WO05114215A2; WO0155366C2).

Los bucles CDR de un dominio TCR variable definen la especificidad por el antígeno. El resto del dominio se denomina matriz (FR). Estas regiones matriz se componen de estructuras de cadena beta y bucles.

30 Los bucles que no son bucles CDR en un dominio TCR nativo no tienen especificidad de unión antigénica o unión a epítopos pero contribuyen al plegamiento general correcto del dominio TCR y en consecuencia también al posicionamiento correcto de las CDR y la interacción entre dominios. Estos bucles se denominan bucles estructurales para los fines de la presente invención.

35 Las regiones matriz de dominios TCR se han modificado por ejemplo, por estabilización de los dímeros. Los documentos WO06037960A2 y WO06056733A1 describen la introducción de un enlace disulfuro intercatenario no nativo. El documento WO0157211A1 describe la heterodimerización de cadenas de TCR por fusión de péptidos con cremallera de leucina.

40 El documento EP0640130B1 describe proteínas análogas de la superfamilia de inmunoglobulinas quiméricas (proteínas chi) que tienen más de un sitio biológico de unión (dominios V sencillos o Fvs). Los sitios de unión en estas proteínas están compuestos por regiones hipervariables derivadas de moléculas relacionadas con la superfamilia de inmunoglobulinas, que incluye inmunoglobulinas, antígenos de superficie celular (tales como antígenos de células T) y receptores celulares (tales como el receptor Fc). Las regiones hipervariables se llaman "regiones tipo CDR" y definen sitios de unión al ligando. Adicionalmente, la proteína-chi tiene al menos un segmento de sitio de unión al ligando más, también una región tipo CDR, empalmados en las regiones tipo FR del dominio del barril beta.

50 Cada sitio de unión al ligando de la proteína-chi por lo tanto está compuesto por una región tipo CDR derivada de moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, un sitio de unión al ligando de las CDR derivadas de una molécula de inmunoglobulina cuyo ligando es un antígeno.

El documento EP0640130B1 por tanto enseña como empalmar regiones tipo CDR con una especificidad determinada a partir de una molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas en bucles estructurales de un dominio variable.

60 Los inventores de las proteínas-chi postulan que se pueden preparar anticuerpos biespecíficos por esta técnica. Sin embargo, es necesario en esta técnica que las orientaciones relativas de los bucles tipo CDR (simetría de bucles CDR) de un dominio variable se reproduzca en una aproximación razonable a la orientación relativa de los bucles estructurales. El documento EP0640130B1 reivindica que tal aproximación a la simetría del bucle tipo CDR existe para los bucles estructurales. Sin embargo, hay dudas de que la orientación de los bucles CDR y los bucles estructurales sea similar con detalles y resolución suficientes; en consecuencia no se ha descrito hasta la fecha que sea posible actualmente desarrollar moléculas biespecíficas por esta técnica.

65 El documento EP0640130B1 ejemplifica que el R19.9 (un anticuerpo monoclonal murino específico del p-azobenzenoarsonato) y 26-10 (anticuerpo monoclonal murino específico de la ouabaína) se utilizaron como la matriz

que proporcionaba los bucles CDR primarios respectivamente, y se injertaron los bucles CDR del anticuerpo anti-lisozima murino D1.3 en las regiones de bucles estructurales. Sin embargo, no se describe la especificidad funcional tras el injerto.

5 Otro ejemplo describe que el anticuerpo 26-10 de cadena sencilla específico de la ouabaína podía mantener su especificidad para ouabaína tras el injerto de dos CDR del anticuerpo específico de lisozima en los bucles estructurales del fragmento Fv de anticuerpo de cadena sencilla específico de ouabaína. Sin embargo, no se describe que el fragmento de anticuerpo que se hizo de acuerdo con este método tuviera también especificidad de unión a la lisozima.

10 Con el fin de proporcionar funciones adicionales a las moléculas TCR se han diseñado varias moléculas de fusión: Mosquera et al. (2005) J Immunol 174:4381 4388 describe una nueva proteína de fusión de IgG1 humana con un TCR de cadena sencilla tipo anticuerpo; Epel et al. (2002) Cancer Immunol Immunother 51:565 573 describe un fragmento de receptor de células T de cadena sencilla recombinante funcional fusionado a una proteína de exotoxina A, capaz de dirigirse selectivamente a células presentadoras de antígeno. Se ha informado que la fusión de un TCR de cadena sencilla a IL-2 reduce la metástasis pulmonar en un modelo de tumor de ratón transgénico (Card et al. (2004) Cancer Immunol Immunother 53:345 357). El documento WO06054096A2 describe una proteína soluble bifuncional que comprende una asociación entre un receptor de célula T (TCR) y un superantígeno.

15 Introducir funciones adicionales en las moléculas TCR es de gran valor terapéutico, diagnóstico y de aplicaciones analíticas. La generación de proteínas de fusión es una estrategia para conseguir este objetivo. Las proteínas de fusión, sin embargo, son a menudo difíciles de producir y pueden dar lugar a un aumento de la inmunogenicidad si se utiliza la molécula terapéuticamente. El injerto de bucles CDR en las regiones de bucles estructurales de dominios variables no se ha demostrado que permitan la modificación de moléculas biespecíficas.

20 La presente invención proporciona una solución para la introducción de nuevas funciones en las moléculas TCR.

Breve descripción de la invención

25 La presente invención proporciona ventajosamente un método para modificar un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende una región bucle estructural para introducir un nuevo sitio de unión al antígeno en dicha región bucle estructural de dicho polipéptido del dominio del receptor de células T, en el que el bucle estructural no es un bucle CDR, y determina la unión de dicho polipéptido del dominio del receptor de células T a un epítipo de un antígeno, en que el polipéptido del dominio del receptor de células T sin modificar no se une significativamente a dicho epítipo de dicho antígeno que comprende las etapas de:

- 30
- proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos una región bucle estructural.
 - modificar al menos un resto de nucleótido de al menos una de las regiones de bucle estructural por mutación aleatoria dirigida al sitio, en donde se intercambian o introducen dos o más restos de aminoácido específicos de los bucles utilizando inserciones generadas aleatoriamente en tales bucles estructurales,
 - 35 - transferir dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
 - expresar dicho polipéptido del dominio del receptor de células T modificado,
 - 40 - poner en contacto el polipéptido del dominio del receptor de células T expresado con dicho epítipo, y
 - determinar si dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se une con dicho epítipo.

45 Según la invención, los polipéptidos del dominio del receptor de células T obtenidos de esta manera se pueden unir específicamente a un epítipo único pero también a dos o más epítipos. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T de acuerdo con la divulgación pueden ser de origen humano o animal, preferentemente de origen humano o murino. Los dominios del receptor de células T inventivos pueden seleccionarse por los dominios variables o constantes, preferentemente de los dominios V-alfa, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alfa, C-beta, C-gamma, C-delta.

50 Según una realización específica de la invención las regiones bucle modificadas de los dominios variables pueden comprender al menos una modificación en los aminoácidos 11 a 19, aminoácidos 43 a 51, aminoácidos 67 a 80 o aminoácidos 90 a 99. Las regiones bucle modificadas de los dominios constantes pueden comprender al menos una modificación en los aminoácidos 9 a 20, aminoácidos 27 a 36, aminoácidos 41 a 78, aminoácidos 82 a 85, aminoácidos 90 a 102 o aminoácidos 107 a 116. La numeración de las posiciones de aminoácidos de los dominios son los de IMGT.

>

60 El método de acuerdo con la invención proporciona por ejemplo una modificación de al menos un nucleótido de un ácido nucleico que da lugar a una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos del polipéptido del dominio del receptor de células T codificado por dicho ácido nucleico.

65 De manera alternativa, al menos un aminoácido de al menos una región bucle estructural se modifica por mutación aleatoria dirigida al sitio, en que la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente puede comprender al

menos una unidad de repetición de nucleótido que tiene la secuencia codificante NNS, NNN, NNK, TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, en que la secuencia codificante es según la IUPAC.

5 También se describen en el presente documento polipéptidos del dominio del receptor de células T que se obtienen por este método y su uso para la preparación de bibliotecas de proteínas de variantes de polipéptidos del dominio del receptor de células T.

10 También se describen en el presente documento bibliotecas que comprenden al menos s10 polipéptidos del dominio del receptor de células T o receptores de células T con una modificación en al menos una región bucle estructural, de manera alternativa con mutaciones de al menos 3 posiciones de aminoácidos en la menos un región bucle estructural. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T pueden ser V-alfa, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alfa, C-beta, C-gamma o C-delta.

15 También se describe en el presente documento un método que proporciona la unión específica y/o detección de una molécula, que comprende las etapas de (a) poner en contacto una biblioteca de receptores de células T modificados o polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que se obtienen por el método inventivo con una muestra de ensayo que contiene dicha molécula, y opcionalmente (b) detectar la formación potencial de un complejo receptor de células T específico/molécula.

20 También se describe en el presente documento un método para aislar específicamente un receptor de células T que se une a una molécula que comprende las etapas de (a) poner en contacto una biblioteca de receptores de células T modificados o un receptor de células T modificado por un método de acuerdo con la invención con una muestra que contiene dicha molécula, (b) separar el complejo de receptor de células T modificado específico/molécula que se ha formado, y (c) aislar opcionalmente el receptor de células T modificado de dicho complejo.

25 También se describe en el presente documento un kit de unión de equivalentes que contiene (a) una biblioteca de receptores de células T modificados o polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que se obtienen por el método inventivo y (b) una molécula de unión que contiene un epítipo o un antígeno.

30 La molécula de unión del kit se puede utilizar para seleccionar un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado de una biblioteca que se describe en el presente documento.

35 También se describe en el presente documento un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos una región bucle estructural que comprende dicha al menos una región bucle al menos una modificación que capacita una unión de dicha al menos una región bucle modificada con un epítipo de un antígeno, mientras que el polipéptido del dominio del receptor de células T sin modificar no se une a dicho epítipo.

40 Dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se puede unir preferentemente a una epítipo de un antígeno, por ejemplo proteínas séricas, receptores Fc, moléculas de complemento y seroalbúminas. La unión a estos antígenos pueden ser ventajosas ya que los TCR nativos no tienen funciones efectoras. Desarrollando polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que se unen a receptores Fc como el Fc gamma I, II o III o receptores neonatales o proteínas de complemento, se pueden obtener TCR que tienen capacidades de función efectora. De manera alternativa, la semivida sérica de tales TCR modificados debido a la unión con los receptores Fc neonatales se pueden aumentar si fuera apropiado. Esto puede ser especialmente altamente ventajoso para fines terapéuticos.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T también pueden contener al menos dos regiones de bucle estructurales modificadas.

50 Adicionalmente, el receptor de células T que comprende al menos un dominio del receptor de células T modificado como se ha descrito anteriormente puede ser V-alfa, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alfa, C-beta, C-gamma, C-delta o una parte de las mismas y dicha al menos una región bucle estructural puede comprender al menos 3 modificaciones de aminoácidos.

55 También se describe en el presente documento una molécula o composición que comprende al menos un dominio del receptor de células T modificado y al menos otra molécula de unión, en que dicha otra molécula de unión se selecciona de entre el grupo de dominios del receptor de células T de acuerdo con, inmunoglobulinas, receptores solubles, ligandos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Dicha molécula o composición puede caracterizarse además por que las regiones bucle modificadas de una V-alfa, V-beta, V-gamma, V-delta comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 11 a 19, aminoácidos 43 a 51, aminoácidos 67 a 80 o aminoácidos 90 a 99, donde la numeración de la posición de aminoácidos de los dominios es la del IMGT.

60 De manera alternativa, dicha molécula o composición se puede caracterizar por que las regiones bucle de una C-alfa, C-beta, C-gamma, C-delta comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 9 a 20, aminoácidos 27 a 36, aminoácidos 41 a 78, aminoácidos 82 a 85, aminoácidos 90 a 102 o aminoácidos 107 a 116, donde la numeración de la posición de aminoácidos de los dominios es la del IMGT.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica dicho dominio del receptor de células T o parte del mismo.

Descripción detallada de la invención

5 Un “bucle estructural” o “bucle no CDR” de acuerdo con la presente invención se tiene que entender de la siguiente manera: los receptores de célula T están hechos de dominios con un denominado plegamiento de inmunoglobulinas. En esencia, láminas beta antiparalelas se conectan por bucles para formar un barril comprimido antiparalelo beta. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad de los TCR, es decir, la unión a un antígeno. Estos bucles se llaman bucles CDR. Todos los otros bucles de los dominios variables del anticuerpo sobre todo contribuyen a la estructura de la molécula y/o la interacción con otros dominios. Esos bucles se definen en el presente documento como bucles estructurales y bucles no CDR.

15 Los receptores de células T son moléculas en las células T, con el fin de esta invención también se incluyen moléculas derivadas de los receptores de células T que incluyen pero no se limitan a proteínas de fusión, secuencias quiméricas del receptor de células T con otras secuencias de dominio de inmunoglobulinas; receptores de células T solubles, receptores de células T de cadena sencilla, receptores de células T dimerizadas en cremallera.

20 Un polipéptido de dominio TCR es un tramo de aminoácidos derivados de dominios variables o constantes de TCR que comprenden al menos un bucle estructural.

El término inmunoglobulina del presente documento se utiliza para anticuerpos, fragmentos de los mismos, regiones variables, regiones constantes y moléculas de fusión de los mismos.

25 En particular, la presente invención se refiere a un método para modificar un polipéptido del dominio del receptor de células T que se une específicamente con sus bucles estructurales modificados a un epítipo de un antígeno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, receptores Fc, proteínas del sistema de complemento, moléculas del suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y antígenos víricos.

35 En una realización el péptido el dominio del receptor de células T se une con sus bucles estructurales modificados específicamente a al menos dos de tales epítopos que se diferencian entre ellos, sean del mismo antígeno o de antígenos diferentes.

40 Se debe entender que la expresión “polipéptido del dominio del receptor de células T”, “dominio del receptor de células T modificado” o “dominio del receptor de células T de acuerdo con la invención” incluye también un derivado de un receptor de células T. Un derivado es una combinación de uno o más dominios del receptor de células T de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquiera de los dominios del receptor de células T se pueden fusionar en cualquier posición de una o más proteínas distintas, incluyendo, pero sin limitarse a otros dominios del receptor de células T, dominios de inmunoglobulinas, partes Fc, ligandos, proteínas scaffold, enzimas, toxinas, proteínas del suero y similares. Un derivado del receptor de células T de la invención se puede obtener también conectando el polipéptido del dominio del receptor de células T de la invención a otras sustancias por varias técnicas químicas tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, enlaces disulfuro, etc. Las otras sustancias que se unen al péptido del dominio del receptor de células T pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es un polipéptido del dominio del receptor de células T con la misma secuencia de aminoácidos pero fabricado completamente o en parte con aminoácidos no naturales o modificados químicamente.

50 Las moléculas modificadas serán útiles como proteínas de una sola cadena así como proteínas de fusión o derivados, la mayoría fusionadas normalmente de tal manera que son parte de estructuras de receptor de células T mayores o moléculas completas de receptor de células T, o partes de las mismas tal como receptores de células T de cadena sencilla biespecíficos o multiespecíficos o formulaciones combinadas en las que los polipéptidos modificados se combinan según se necesite. Será posible utilizar las proteínas modificadas para producir moléculas que son mono-específicas, biespecíficas, triespecíficas y pueden llevar incluso más especificidades al mismo tiempo según las necesidades del uso planificado para tales moléculas.

60 De acuerdo con la presente invención, las regiones de unión a antígenos o los sitios de unión antigénica de todos los tipos de alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas receptores Fc, proteínas del sistema de complemento, moléculas del suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y antígenos víricos, se pueden introducir en una región bucle estructural de una determinada estructura del dominio receptor de células T. Los antígenos pueden ser moléculas de origen natural o moléculas sintetizadas químicamente o moléculas recombinantes, todas ellas en solución o sobre o en partículas tales como fases sólidas o sobre o en células o sobre superficies víricas.

65

Los antígenos preferidos son las proteínas del suero, los receptores Fc, tales como Fc gamma I, II, III, receptores Fc neonatales, moléculas de complemento y seroalbúminas.

5 Los términos y expresiones “alergenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, receptores Fc, proteínas del sistema de complemento, moléculas del suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos, y antígenos víricos” incluirán todos los alérgenos y antígenos y dianas capaces de ser reconocidas por un receptor de células T o anticuerpo., y fragmentos de tales moléculas así como moléculas pequeñas tales como los haptenos.

10 El término “epítipo” significará una estructura molecular que puede constituirse en una pareja de unión específica o ser parte de una pareja de unión específica para el dominio de unión o el polipéptido del dominio del receptor de células T.

15 Químicamente, un epítipo puede estar compuesto o bien por un carbohidrato, un péptido, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica o derivados de los mismos en cualquier combinación de los mismos. Si un epítipo es un polipéptido, habitualmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferentemente de 9 a 50 aminoácidos, y más preferentemente entre aproximadamente 10-20 aminoácidos en el péptido. No hay un límite superior crítico para la longitud del péptido, que podría comprender casi la longitud completa de una secuencia de polipéptido. Los epítipos pueden ser epítipos lineales o conformacionales. Un epítipo lineal está compuesto por un segmento sencillo de una secuencia primaria de una cadena polipeptídica. Los epítipos lineales pueden ser contiguos o solapados. Los epítipos conformacionales están compuestos por aminoácidos que se disponen juntos por plegamientos del polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no están necesariamente adyacentes unos a otros en la secuencia lineal.

25 Los “alergenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, receptores Fc, proteínas del sistema de complemento, moléculas del suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos, y antígenos víricos”, son los alérgenos o antígenos, que ya se ha probado que son capaces de ser relevantes inmunológica o terapéuticamente, especialmente, de los que se ha ensayado una eficacia clínica.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se pueden introducir otras capacidades de unión en las regiones bucle estructurales de los polipéptidos del dominio del receptor de células T, por ejemplo las capacidades de unión para moléculas pequeñas, para fármacos o enzimas, sitios catalíticos de enzimas o sustratos de enzimas o la unión a un estado de transición análogo a un sustrato enzimático.

35 Preferentemente el nuevo sitio de unión al antígeno en los bucles estructurales es ajeno al polipéptido del dominio del receptor de células T sin modificar. PO tanto se prefieren dianas tales como moléculas efectoras, proteínas del suero o receptores Fc y moléculas de la superficie celular como parejas de unión del polipéptido del dominio del receptor de células T.

40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “se une específicamente” o “unión específica” se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. Por tanto, bajo condiciones determinadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo), el polipéptido del dominio del receptor de células T especificado se une a su “diana” particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra.

45 La expresión “sistema de expresión” se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en una unión operativa, de forma que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Con el fin de efectuar la transformación, los sistemas de expresión se pueden incluir en un vector; sin embargo, el ADN relevante también se puede integrar entonces en el cromosoma del huésped. De manera alternativa, se puede utilizar un sistema de expresión para la transcripción/traducción in vitro.

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención el polipéptido del dominio TCR es de origen humano o animal, preferentemente de origen camélido, de conejo, de pollo, de rata, de perro, de caballo, de oveja o murino.

55 Como el polipéptido del receptor de células T modificado se puede emplear para varios propósitos, en particular en composiciones farmacéuticas, el polipéptido del dominio del receptor de células T es preferentemente de origen humano o murino. Por supuesto, el polipéptido del receptor de células T modificado puede ser también un polipéptido del dominio del receptor de células T humanizado o quimérico. En la realización de la presente invención más preferida el polipéptido del dominio del receptor de células T es de origen humano o una versión humanizada de un polipéptido del dominio del receptor de células T de cualquier especie.

60 Las regiones bucle estructurales de un polipéptido de dominio del receptor de células T se seleccionan preferentemente a partir de bucles estructurales que comprende los aminoácidos 11 a 19, aminoácidos 43 a 51, aminoácidos 67 a 80 o aminoácidos 90 a 99, donde la numeración de la posición de aminoácidos de los dominios es la de la IMGT.

Las regiones bucle estructurales de un polipéptido del dominio constante del receptor de células T se seleccionan preferentemente de entre los bucles estructurales que comprende los aminoácidos 9 a 20, aminoácidos 27 a 36, aminoácidos 41 a 78, aminoácidos 82 a 85, aminoácidos 90 a 102 o aminoácidos 107 a 116, donde la numeración de la posición de aminoácidos de los dominios es la de la IMGT.

5 Preferentemente, los nuevos sitios de unión al antígeno en los bucles estructurales se introducen en los polipéptidos del dominio del receptor de células T codificados por el ácido nucleico seleccionado por sustitución, deleción y/o inserción de al menos un nucleótido.

10 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención la modificación del al menos un nucleótido en al menos una región bucle estructural da como resultado una sustitución, deleción y/o inserción en el polipéptido del dominio del receptor de células T codificado por dicho ácido nucleico.

15 La modificación de al menos una región bucle de un polipéptido del dominio del receptor de células T puede dar lugar a una sustitución y/o inserción de dos o más aminoácidos, preferentemente mutaciones puntuales, cambio de aminoácidos de bucles completos, más preferido el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hasta 30 aminoácidos.

20 De acuerdo con la invención, el método para introducir modificaciones es la mutación aleatoria dirigida al sitio. Con este método se intercambian dos o más restos de aminoácidos específicos de los bucles o se introducen utilizando inserciones generadas aleatoriamente en tales bucles estructurales. Alternativamente se prefiere el uso de estrategias de combinación.

25 En otra realización preferida al menos dos, en otra realización preferida al menos tres regiones bucle estructurales de un polipéptido del dominio el receptor de células T se mutan o modifican por métodos de mutagénesis aleatoria, semi-aleatoria o, en particular, aleatoria dirigida al sitio.

30 Estos métodos se pueden utilizar para hacer modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas del polipéptido del dominio del receptor de células T. En estos casos las posiciones se eligen aleatoriamente, o los cambios de aminoácidos se hacen utilizando ciertas reglas. Por ejemplo, ciertos restos se pueden mutar en cualquier aminoácido, mientras que otros restos pueden mutarse en un grupo restringido de aminoácidos. Esto se puede conseguir de una manera gradual alternando los ciclos de mutación y selección o simultáneamente.

35 Un método preferido de acuerdo con la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente que codifica un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos una unidad de repetición de nucleótido con una región codificante del bucle estructural que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5 -NNN-3 o 5 - NNK-3. En algunas realizaciones el ácido nucleico modificado comprende codones de nucleótidos de entre el grupo TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, NNK, NNN, NNS o cualquier combinación de los mismos. (la codificación es según la IUPAC).

40 Las moléculas de ácido nucleico modificado aleatoriamente pueden comprender las unidades de repetición identificadas anteriormente, que codifican todos los aminoácidos de origen natural conocidos o un subgrupo de las mismas.

45 La modificación de la molécula de ácido nucleico se puede llevar a cabo introduciendo oligonucleótidos sintéticos en un segmento más grande de ácido nucleico o por síntesis de novo de una molécula de ácido nucleico completa. La síntesis de ácido nucleico también se puede llevar a cabo con bloques de construcción de tri-nucleótidos lo que reduciría el número de combinaciones de secuencias sin sentido se se va a codificar un subgrupo de aminoácidos (por ejemplo, Yanez et al. *Nucleic Acids Res.* (2004) 32:e158; Virnekas et al. *Nucleic Acids Res.* (1994) 22:5600-5607).

50 Preferentemente las posiciones que se van a modificar son aminoácidos expuestos en la superficie. La exposición en la superficie de aminoácidos de bucles estructurales se pueden evaluar a partir de estructuras proteicas conocidas de polipéptidos del dominio del receptor de células T y por analogía (homología) de tales secuencias de aminoácidos para las que no está disponible una estructura determinada experimentalmente.

55 En una realización preferida de la invención las modificaciones introducidas en al menos un bucle estructural comprende al menos 2, 3, 4, 5, o 6 aminoácidos de origen no natural en el sitio respectivo del bucle estructural del polipéptido del dominio del receptor de células T no modificado.

60 La modificación de aminoácidos se puede predisponer preferentemente con el fin de introducir aminoácidos en las regiones bucle estructurales que se sabe que están implicados frecuentemente en interacciones proteína-proteína (por ejemplo, Lea & Stewart (1995) *FASEB J.* 9:87-93; Fellhouse et al. (2006) *J. Mol. Biol.* 357:100-114; Adib-Conquy et al. (1998) *International Immunology* 10:341-346; Lo Conte et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 285:2177-2198; Zemlin et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 334:733-749).

En una realización preferida, se utiliza una biblioteca de variantes de polipéptido que comprende polipéptidos del dominio del receptor de células T de la invención como un grupo de selección en el que las modificaciones contienen o introducen al menos uno, más preferentemente al menos dos aminoácidos por bucle estructural modificado, preferentemente fuera el grupo de aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, isoleucina, serina, metionina, alanina y asparagina.

La modificación del bucle estructural del polipéptido del dominio del receptor de células T de acuerdo con la presente invención es preferentemente una delección, sustitución o una inserción de uno o más aminoácidos.

De acuerdo con la presente invención, al menos 2, preferentemente, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y hasta 30 aminoácidos se han eliminado, sustituido por otros aminoácidos (también por aminoácidos modificados) o insertado en la región bucle estructural del polipéptido del dominio del receptor de células T. Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en una región bucle estructural de un polipéptido del dominio del receptor de células T puede no exceder de 30, preferentemente, 25, más preferentemente 20 aminoácidos.

Como se conoce bien en la técnica, hay varias tecnologías de selección que se pueden utilizar para la identificación y aislamiento de proteínas con ciertas características de unión y afinidades, incluyendo por ejemplo, tecnologías de presentación tales como fago de presentación, presentación de ribosoma, presentación en la superficie celular, y similares, como se describe posteriormente. Los métodos de producción y selección de variantes de TCR se conocen bien en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos del dominio del receptor de células T (y siempre incluidas a través de toda la especificación posterior: receptores de células T y fragmentos del receptor de células T que comprenden un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado) se pueden clonar en células huésped, expresar y ensayar sus especificidades de unión. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, y varios métodos que se pueden utilizar en la presente invención se describen en *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede incorporar en un vector de expresión con el fin de expresar dichos polipéptidos del dominio del receptor de células T. Los vectores de expresión normalmente comprenden un polipéptido del dominio del receptor de células T unido operativamente - es decir situado en relación funcional - con secuencias de control o reguladoras, marcadores genéticos, cualquier pareja de fusión, y/o elementos adicionales. El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede producir cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferentemente un vector de expresión, que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido del dominio del receptor de células T, bajo condiciones apropiadas para inducir o producir la expresión del polipéptido del dominio del receptor de células T modificado. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico exógenas en un huésped se conocen bien en la técnica, y variarán con el huésped que se utilice. Por supuesto, también se pueden emplear sistemas de expresión no celulares o libres de células para la expresión de polipéptidos del dominio del receptor de células T.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden purificar o aislar tras la expresión. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T se pueden aislar o purificar con varias maneras conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación de referencia incluyen las técnicas cromatográficas, electroforéticas, inmunológicas, precipitación, diálisis, filtración, concentración y técnicas de cromatografía. La purificación a menudo se puede hacer posible por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, se pueden purificar los TCR utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad Ni^{2+} si se emplea una marca His o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se utiliza una marca flag. Como guía general de las técnicas de purificación adecuadas véase, por ejemplo, Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", 1994, 3ª ed., Springer-Science and Business Media Inc., NY o Roe, "Protein Purification Techniques : A Practical Approach", 2001, Oxford University Press. Por supuesto, también es posible expresar el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado en la superficie de un huésped, en particular en la superficie de una células bacteriana, de insecto o de levadura o en la superficie de fagos o virus.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden seleccionar utilizando varios métodos, incluyendo pero sin limitarse a los que utilizan ensayos in vitro, in vivo y ensayos basados en células, y tecnologías de selección. Se pueden utilizar tecnologías de selección automática y de alto rendimiento en los procedimientos de selección. La selección puede emplear el uso de una pareja de fusión o marcador, por ejemplo una enzima, un marcador inmunitario, un marcador isotópico, o un marcador de molécula pequeña tales como colorantes fluorescente o colorimétrico o una molécula luminogénica.

En una realización preferida, las propiedades biofísicas y/o funcionales de los polipéptidos del dominio del receptor de células T se seleccionan en un ensayo in vitro. En una realización preferida, el TCR se selecciona por funcionalidad, por ejemplo, su capacidad de catalizar una reacción o su especificidad de unión, reactividad cruzada y/o afinidad por su diana.

En otra realización preferida, los polipéptidos del dominio del receptor de células T favorables se pueden seleccionar *in vivo*, por ejemplo, introduciéndolos en una célula o un organismo. Las variantes de unión específica se pueden aislar o desde los fluidos corporales tales como sangre o líquido linfático o a partir de órganos específicos, dependiendo de las propiedades necesarias de los dominios modificados.

5 Los ensayos pueden emplear varios métodos de detección incluyendo pero sin limitarse a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos.

10 Como se sabe en la técnica, algunos métodos de selección seleccionan los miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se designan en el presente documento como “métodos de selección”, y estos métodos se utilizan en la presente invención para seleccionar los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados. Cuando las bibliotecas de variantes del polipéptido del dominio del receptor de células T se seleccionan utilizando un método de selección, solo los miembros de una biblioteca que son favorables, es decir los que cumplen alguno de los criterios de selección, se propagan, aíslan y/o se observan. Como se apreciará, debido a que solo se observan las variantes ajustadas, tales métodos posibilitan la selección de bibliotecas que son más grandes que las seleccionables por métodos que ensayan el ajuste de los miembros de la biblioteca individualmente. La Selección es posible por cualquier método, técnica, o pareja de fusión que une, covalentemente o no covalentemente, el fenotipo del polipéptido del dominio del receptor de células T con su genotipo, que es la función de un polipéptido del dominio del receptor de células T con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de un fago de presentación como un método de selección se hace posible por la fusión de miembros de la biblioteca con una proteína de la envoltura del fago. La que se utiliza más frecuentemente es la proteína genética III filamentososa del fago, sin embargo también se pueden utilizar otras proteínas de la envoltura tales como la proteína VII, proteína VII, proteína VI y proteína IX. De esta manera, la selección o el aislamiento de polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que cumplen alguno de los criterios, por ejemplo la afinidad de unión a la diana del polipéptido del dominio del receptor de células T, también selecciona o aísla el ácido nucleico que lo codifica. Una vez aislado, el gen o genes que codifican los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden entonces amplificar. Este proceso de aislamiento y amplificación, designado como “panning”, se puede repetir, permitiendo que se enriquezcan las variantes del polipéptido del dominio del receptor de células T favorables de la biblioteca. Por último la secuenciación de ácido nucleico del ácido nucleico unido permite la identificación genética.

30 Se conocen varios métodos de selección en la técnica que son útiles en la presente invención para explorar bibliotecas de polipéptidos del dominio del receptor de células T (documentos WO04044004A2, WO05116646A1 y WO9839482A1; Dunn et al. (2006) *Protein Sci.* 15:710-721; Richmann et al. (2006) *Protein Eng Des Sel.* 19:255-264). Estos incluyen pero no se limitan a todas las técnicas que se han utilizado para la selección de anticuerpos específicos y péptidos tales como fagos de presentación ((Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30:10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228:1315-1317) y sus derivados tales como la infección por fagos selectivos (Malmborg et al., 1997, *J Mol Biol* 273:544-551), fagos infecciosos selectivamente (Krebber et al., 1997, *J Mol Biol* 268:619-630), panning infeccioso retrasado (Benhar et al., 2000, *J Mol Biol* 301:893-904), presentación en superficie celular (Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12:395-399) tal como presentación en bacterias (Georgiou et al., 1997, *Nat Biotechnol* 15:29-34; Georgiou et al., 1993, *Trends Biotechnol* 11:6-10; Lee et al., 2000, *Nat Biotechnol* 18:645-648; Jun et al., 1998, *Nat Biotechnol* 16:576-80), levaduras (Boder & Wittrup, 2000, *Methods Enzymol* 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15:553-557), y células de mamíferos (Whitehorn et al., 1995, *Bio/technology* 13:1215-1219), así como técnicas de presentación *in vitro* (Amstutz et al., 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12:400-405) tal como presentación en polisomas (Mattheakis et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9022-9026), presentación en ribosomas (Hanes et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4937-4942), presentación en ARNm (Roberts & Szostak, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12297-12302; Nemoto et al., 1997, *FEBS Lett* 414:405-408), y sistema de presentación de inactivación de ribosomas (Zhou et al., 2002, *J Am Chem Soc* 124, 538-543).

50 Otros métodos de selección que se pueden utilizar en la presente invención incluyen métodos que no se basan en la presentación, tales como métodos *in vivo* que incluyen, pero no se limitan a expresión periplásmica y selección citométrica (Chen et al., 2001, *Nat Biotechnol* 19:537-542), ensayo de fragmento de complementación (Johnsson & Varshavsky, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10340-10344; Pelletier et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12141-12146), y la selección de dos híbridos de levadura (Fields & Song, 1989, *Nature* 340:245-246) que se utiliza en el modo de selección (Visintin et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11723-11728). En una realización alternativa, se hace posible la selección por una pareja de unión que se une a una secuencia específica en el vector de expresión, que se une covalente o no covalentemente a la pareja de fusión y se asocia al miembro de la biblioteca del polipéptido del dominio del receptor de células T con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, el documento WO9308278 describe tal pareja de fusión y una técnica que es útil en la presente invención. En una realización alternativa, se puede producir la selección *in vivo* si la expresión del polipéptido del dominio del receptor de células T da lugar a alguna ventaja en el crecimiento, reproducción, o supervivencia de la célula.

65 A algunos métodos se les denomina métodos de “evolución directa”. Estos métodos incluyen el emparejamiento o reproducción de secuencias favorables durante la selección, a veces con la incorporación de nuevas mutaciones. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los métodos de evolución directa puede facilitar la identificación de las secuencias más favorables en una pluralidad de polipéptidos, y pueden aumentar la diversidad de secuencias

que se seleccionan. Se conocen en la técnica varios métodos de evolución que son útiles en la presente invención para generar y seleccionar variantes de polipéptidos del dominio del receptor de células T, que incluyen pero no se limitan a barajado de ADN (documentos PCT WO00/42561; PCT WO 01/70947), combinación de exones (Kolkman & Stemmer, 2001, *Nat Biotechnol* 19:423-428), combinación de familias (Cramer et al., 1998, *Nature* 391:288-291), aleatorización combinatoria selectiva (documentos WO03012100, WO04018674A1), Quimerogénesis Aleatoria en Matrices Transitorias (Coco et al., 2001, *Nat Biotechnol* 19:354-359), recombinación in vitro por evolución molecular por proceso de extensión escalonado (StEP) (Zhao et al., 1998, *Nat Biotechnol* 16:258-261; Shao et al., 1998, *Nucleic Acids Res* 26:681-683), ensamblaje genético mediado por exonucleasa (Pat. de EE. UU. N° 6.352.842; Pat. de EE. UU. N° 6.361.974), Mutágenesis genética por saturación del sitio (Pat. de EE. UU. N° 6.358.709), Reensamblaje genético (Pat. de EE. UU. N° 6.358.709), SCRATCHY (Lutz et al., 2001, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi et al., *Gene* 236:159-167), barajado de ADN monocatenario (Kikuchi et al., 2000, *Gene* 243:133-137), y tecnología de modificación de anticuerpos de evolución directa (Evolución Molecular Aplicada) (Pat. de EE. UU. N° 5.824.514; Pat. de EE. UU. N° 5.817.483; Pat. de EE. UU. N° 5.814.476; Pat. de EE. UU. N° 5.763.192; Pat. de EE. UU. N° 5.723.323).

En una realización preferida, las variantes del polipéptido del dominio del receptor de células T se seleccionan utilizando uno o más ensayos basados en células o in vivo. Para tales ensayos, se añaden normalmente polipéptidos del dominio del receptor de células T purificados o no purificados exógenamente tal que las células se exponen a polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados o grupos de polipéptidos del dominio del receptor de células T que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan normalmente, pero no siempre, en la función deseada del polipéptido del dominio del receptor de células T; es decir, la capacidad del polipéptido del dominio del receptor de células T modificado de acuerdo con la invención para unirse a su diana y para mediar algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo, la función efectora, la semivida en el suero, la inhibición de la unión al ligando/receptor, apoptosis, y similares. Tales ensayos implican a menudo el control de la respuesta de las células al polipéptido del dominio del receptor de células T, por ejemplo, supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o un gen indicador. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de las variantes del polipéptido del dominio del receptor de células T para inducir ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos, se puede necesitar la adición de células o componentes adicionales, que estén además de las células diana, por ejemplo, complemento del suero, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, y similares. Tales células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferentemente de seres humanos, ratón, rata, conejo y mono. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T pueden producir apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar en el ataque a las células diana por células inmunitarias que se han añadido en el ensayo. Los métodos para controlar la muerte o viabilidad celular se conocen en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos, y radioactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción por caspasa pueden hacer posible medir la apoptosis, y la captación o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes puede hacer posible que se controlen el crecimiento o la activación. De manera alternativa, se pueden controlar las células diana muertas o dañadas midiendo la liberación de uno o más componentes intracelulares naturales, por ejemplo, la lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta se puede controlar ensayando los genes naturales que pueden estar regulados positivamente, por ejemplo se puede medir la liberación de ciertas interleucinas, o alternativamente la lectura puede ser por medio de un sistema indicador. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medición de cambios morfológicos de células como una respuesta a la presencia de polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados. Los tipos celulares para tales ensayos pueden ser procariontes o eucariotes, y se pueden emplear varias líneas celulares es que se conocen en la técnica.

De manera alternativa, la selección basada en células se puede llevar a cabo utilizando células que se han transformado o transfectados con ácidos nucleicos que codifican las variantes de los polipéptidos del dominio del receptor de células T. En este caso, las variantes del polipéptido del dominio del receptor de células T de la invención no se añaden exógenamente a las células (por ejemplo, al igual que Auf der Maur, 2004, *Methods*, 34:215-224). En otro método alternativo, la selección basada en células utiliza la presentación en la superficie celular. Se puede emplear una pareja de fusión que haga posible de presentación de polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados en la superficie de las células (como se ha demostrado por fragmentos de anticuerpos: Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12:395-399).

En una realización preferida, la inmunogenicidad del polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede determinar experimentalmente utilizando un o más ensayos inmunológicos o basado en células (por ejemplo, Koren et al., 2002, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 3:349-360; Chirino et al., 2004, *Drug Discovery Today* 9:82-90; Tangri et al., 2005, *J. Immunol.* 174:3187-3196; Hermeling et al., 2004, *Pharm. Res.* 21:897-903). En una realización, se utilizan ensayos de activación de células T ex vivo para cuantificar la inmunogenicidad experimentalmente. En este método, se desafían células presentadoras de antígeno y células T intactas de donantes coincidentes con un péptido o con el polipéptido del dominio del receptor de células T completo de interés una vez o más. Se puede detectar la activación de las células T utilizando varios métodos, por ejemplo, controlando la liberación de citoquinas o midiendo la captación de timidina tritiada. En realizaciones preferidas se utiliza la tecnología LUMINEX para medir la liberación de citoquinas (por ejemplo, de Jager et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003, 10:133-139) o se controla la producción de interferón gamma utilizando ensayos Elispot (Schmittel et. al., 2000, *J. Immunol. Meth.*, 24: 17-24).

Se pueden caracterizar las propiedades biológicas de los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados en experimentos en células, tejidos, y organismos completos. Como se conoce en la técnica, a menudo los fármacos se ensayan en animales, incluyendo pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir las características farmacocinéticas, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Se puede designar a los animales como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos a menudo se ensayan en ratones, que incluyen pero no se limitan a ratones desnudos, ratones SCID, ratones de aloinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo los mutantes genéticos knock-in y knock-out). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para determinar el potencial de la variante e polipéptido que se va a utilizar como agente terapéutico. Se puede utilizar cualquier organismo, preferentemente mamíferos, para el ensayo. Debido a las similitudes genéticas con el ser humano, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por lo tanto se pueden utilizar para ensayar la eficacia, toxicidad, características farmacocinéticas, y otras propiedades de los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados. Los ensayos en humanos son los más frecuentemente requeridos para la aprobación como agentes terapéuticos, y por tanto estos experimentos por supuesto están contemplados. Por lo tanto el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede ensayar en seres humanos para determinar su eficacia, toxicidad, inmunogenicidad, características farmacocinéticas y/u otras propiedades clínicas.

El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado de la presente invención puede encontrar uso en una amplia gama de productos. En una realización la variante del polipéptido del dominio del receptor de células T se utiliza para terapia o profilaxis, para uso preparativo o analítico, como diagnóstico, como un compuesto industrial o un reactivo de investigación, preferentemente como un agente terapéutico. La variante del polipéptido del dominio del receptor de células T puede encontrar uso en una composición de polipéptido del dominio del receptor de células T que sea monoclonal, oligoclonal o policlonal. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T se pueden utilizar para destruir células diana que tienen el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana, por ejemplo antagonizando una citoquina o un receptor de citoquina. Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana y destruirán las células diana que llevan el antígeno diana.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para bloquear, antagonizar, o agonizar factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y destruye las células diana que portan o necesitan el antígeno diana.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para bloquear, antagonizar, o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para neutralizar agentes infecciosos tales como virus, bacterias u hongos.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados pueden mostrar semivida aumentada en suero.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados pueden mostrar capacidades de función efectora.

Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar con varios fines terapéuticos. Por ejemplo, un receptor de células R que comprende el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar a un paciente para tratar un trastorno específico. Un "paciente" incluye tanto seres humanos como otros animales, preferentemente mamíferos y más preferentemente seres humanos. Por "trastorno específico" en el presente documento se quiere decir un trastorno que se puede mejorar por la administración de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado.

Un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado puede ser el único principio terapéuticamente activo que se administra al paciente. De manera alternativa, el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasas, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar concomitantemente con uno o más regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante de receptor de células T se puede administrar al paciente junto con quimioterapia, radioterapia, o ambas quimioterapia y radioterapia. El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar en conjunción con uno o más anticuerpos. De manera alternativa, se emplean el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado y una o más terapias anticáncer para tratar las células cancerosas ex vivo. Se contempla que este tratamiento ex vivo puede ser útil en el trasplante de médula ósea y particularmente, el trasplante de médula ósea autóloga. Por su puesto se contempla que el polipéptido del dominio del receptor de células T de la invención se puede emplear en combinación con otras técnicas terapéuticas tales como la cirugía.

Se puede utilizar otros varios agentes terapéuticos para su administración con el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado. El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar con un agente anti-angiogénico, que es un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico, por ejemplo, puede ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, fusión Fc, o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento

implicado en la promoción de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido del presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). De manera alternativa, el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede administrar con un inhibidor de la tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe hasta cierto punto la actividad de la tirosina quinasa de una tirosina quinasa. De manera alternativa, los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden administrar con una citoquina. Por "citoquina" en el presente documento se quiere designar un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares que incluyen las quimioquinas.

Se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas en las que se formulan polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados de la misma o diferentes especificidades y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de polipéptidos se preparan para su almacenaje mezclando dichos polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, 16ª edición, Osol, A. Ed.), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones para utilizarse en administración in vivo son preferentemente estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas estériles u otros métodos. El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado y otros agentes terapéuticamente activos desvelados en el presente documento se pueden formular como inmunoliposomas, y/o introducidos en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado o una mezcla de diferentes polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril se puede llevar a cabo por varias vías, incluyendo, pero sin limitarse a vía oral, vía subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal, o intraocular.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención el sistema de expresión comprende un vector. Se puede utilizar para este propósito cualquier vector conocido en la técnica según sea apropiado.

El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se expresa preferentemente en un huésped, preferentemente en una bacteria, en levaduras, en una células vegetal, en una células de insecto, en una célula animal o célula de mamífero o en un órgano de una planta o animal o en un animal o planta completos.

Se puede utilizar una amplia variedad de células huésped para expresar el polipéptido modificado de la invención, incluyendo pero no limitado a células de mamífero (células animales) células vegetales, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), células de insecto, y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, varias líneas celulares que pueden ser útiles en la presente invención se describen en el catálogo de líneas celulares de la ATCC, disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo. Además, también se pueden utilizar plantas y animales como huéspedes para la expresión del polipéptido del dominio del receptor de células T de acuerdo con la presente invención. La expresión así como los vectores de transfección o casetes se pueden seleccionar de acuerdo con el huésped utilizado.

Por supuesto también se pueden utilizar sistemas de expresión no celulares o libres de células. Las plataformas de expresión proteica de transcripción/traducción in vitro, que producen cantidades suficientes de proteínas ofrecen muchas ventajas de una expresión libre de células, eliminando la necesidad de etapas trabajosas corriente arriba y abajo (por ejemplo, transformación de la célula huésped, cultivo o lisis) que se asocian normalmente en los sistemas de expresión basados en células.

La presente divulgación se refiere a un método para fabricar un polipéptido del dominio del receptor de células T, comprendiendo el método al menos una modificación en dicho bucle estructural de dicho polipéptido del dominio del receptor de células T y la determinación de la unión de dicha molécula a un epítipo de un antígeno, en el que la molécula sin modificar no se une significativamente a dicho epítipo, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos una región bucle estructural,
- modificar al menos un resto de nucleótido de al menos una de las regiones de bucle estructural,
- transferir dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- expresar dicho polipéptido del dominio del receptor de células T,
- poner en contacto el polipéptido del dominio del receptor de células T expresado con un epítipo,
- determinar si dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se une con dicho epítipo, y
- proporcionar el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado que se une a dicho epítipo y opcionalmente rematarlo en una preparación farmacéutica.

Se describe en el presente documento un método para fabricar una molécula multiespecífica que se une específicamente a al menos una primera moléculas o una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en cada uno de al menos una región d bucle estructural de dicho polipéptido del dominio del receptor de células T y determinar la unión específica de dicha al menos una región bucle a al menos una segunda

molécula que se selecciona de entre el grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, receptores Fc, proteínas del sistema de complemento, moléculas del suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y antígenos víricos, en el que el polipéptido del dominio del receptor de células T que contiene una región bucle estructural no modificada no se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio del receptor de célula T que se une específicamente a al menos una primera molécula que comprende al menos una región bucle estructural,
- modificar al menos un resto de nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucle estructural codificada por dicho ácido nucleico,
- transferir dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- expresar dicho polipéptido del dominio del receptor de célula T modificado,
- poner en contacto el polipéptido del dominio del receptor de células T expresado con la dicha al menos una segunda molécula, y
- determinar si dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se une con dicha al menos una segunda molécula y
- proporcionar el polipéptido del dominio del receptor de células T que se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula y opcionalmente rematarla en una preparación farmacéutica.

Un TCR puede consistir en una cadena alfa (o una gamma) y una cadena beta (o una delta), que forman juntas una región variable que se une a una pareja específica de unión, y la segunda especificidad se puede formar por bucles estructurales modificados del dominio variable o constante o de la cadena alfa (o gamma) o la cadena beta (o delta). El sitio de unión se puede formar también por al menos uno o más de un bucle no CDR en dos dominios variables o constantes (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena pesada que pueden estar próximos estructuralmente).

Se pueden unir a la pareja mono o multivalentemente, o incluso con diferentes valencias para diferentes parejas de unión, dependiendo del diseño. Por ejemplo, un fragmento de receptor de células T, de manera equivalente a un scTCR se puede modificar de tal manera que los bucles estructurales de ambos dominios variables se modifican por separado para unirse al mismo epítipo que el sitio de unión formado por las CDR, lo que resulta en un receptor de células T o scTCR trivalente respectivamente. Si por ejemplo, el sitio natural de unión formado por las CDR reconoce un epítipo diana diferente que los dominio variables modificados, entonces el fragmento TCR o scTCR resultante se unirá de manera monovalente a la primera diana, y de manera bivalente a la segunda diana, la cual se une independientemente a los bucles estructurales modificados de los dominios variables respectivamente. Este principio de diseño modular se puede aplicar de muchas formas diferentes como será obvio para los expertos en la técnica.

Como están disponibles varios bucles estructurales para la selección y el diseño de un sitio de unión específico en las regiones no CDR de los dominios alfa (gamma) y beta (delta) es posible diseñar derivados del receptor de células T con incluso más de dos especificidades. Por ejemplo los dominios V alfa y V beta que reconocen una primera diana por sus CDR se puede modificar por separado para unirse específicamente a diferentes dianas (segunda y tercera) por medio de interacciones mediadas por los bucles estructurales en los respectivos dominios variables. Por lo tanto, se puede generar un receptor de células T triespecífico o un fragmento del mismo tal como un receptor de células T de cadena sencilla, que se une de manera monovalente a cada uno de sus diferentes dianas.

Los dominios de unión específicos en una cadena polipeptídica se puede conectar con o sin un péptido enlazador y puede no estar necesariamente en el orden natural.

Ni los dominios variables ni los dominios constantes de los receptores de células T median funciones efectoras lo cual es la razón de por qué los fragmentos del receptor de células T no muestran ADCC, ADCP, o CDC. Con la presente invención es posible diseñar un receptor de células T que se una a moléculas efectoras tales como receptores Fc o proteínas de complemento. Los bucles modificados en los dominios del receptor de células T se puede seleccionar de entre una biblioteca de estructuras bucles o se puede diseñar para unirse a una o más moléculas efectoras. Un receptor de células T o un fragmento del mismo con tales sitios de unión a moléculas efectoras harían posible funciones efectoras similares a los anticuerpos y se podrían diseñar dependiendo de las necesidades para mostrar una activación fuerte o débil de ADCC y ADCP y/o del complemento.

Con el fin de seleccionar una función efectora potencial de tales polipéptidos del dominio del receptor de células T, se pueden seleccionar bibliotecas de polipéptidos del dominio del receptor de células T que se unan a receptores Fc y/o factores del complemento tal como el C1q. Los receptores Fc gamma para la selección se pueden proporcionar o sobre la superficie de células que expresan de forma natural los receptores respectivos o por expresión y purificación de la parte extracelular del receptor respectivo. Las células U937 estimuladas con IFN-g (CRL-1503, Colección Americana de cultivos tipo) se pueden utilizar como células diana para el aislamiento del polipéptido del dominio del receptor de células T modificado en el fago de presentación que se une específicamente al receptor IgG de alta afinidad, Fc gamma RI (similar al de Berntzen et al., 2006, Protein Eng Des Sel. 19(3):121-8). Se puede ensayar la unión a l receptor Fc por FACS utilizando células U937 como diana las cuales se tiñen específicamente

con polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados seleccionados. Además, los dominios extracelulares de los receptores Fc gamma humanos se pueden clonar y expresar como proteínas solubles o proteínas de fusión y se utilizan para análisis de la unión específica con parejas de unión potenciales (por ejemplo como en Berntzen et al., 2005, J Immunol Methods. 298(1-2):93-104). La identificación y caracterización de polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados que se unen específicamente al factor de complemento C1q se puede llevar a cabo de manera similar (por ejemplo, como en Lauvrak et al. 1997 Biol Chem. 378(12):1509-19).

En el fin de aumentar la semivida in vivo de una molécula que comprende tal polipéptido del dominio del receptor de células T que se une a FcRn se puede seleccionar con bibliotecas de polipéptidos del dominio del receptor de células T mutantes.

Se pueden proporcionar receptores FcRn para la selección o sobre la superficie de las células que expresan de manera natural los receptores respectivos o por expresión y purificación de la parte extracelular del respectivo receptor. Una primera selección en FcRn puede seleccionar polipéptidos del dominio del receptor de células T mutantes (o moléculas que comprenden tales polipéptidos del dominio del receptor de células T mutantes) que luego se pueden ensayar in vitro e incluso caracterizarse más en experimentos FACS uniéndose a células que expresan el receptor FcRn. La exploración y selección también puede considerar dependencias del pH de la unión al FcRn (como se describe en los documentos PCT WO02/060919; PCT WO97/34631). Se puede además caracterizar por puntuación de afinidad de unión a varios FcRn recombinantes, isoformas y alotipos por ejemplo, con técnicas de plasmones superficiales (por ejemplo, como en Dall' Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169: 5171 5180).

Los receptores de las células T comprenden preferentemente o una cadena alfa y beta o una cadena gamma y delta del receptor de células T o una parte de las mismas.

El receptor de células T modificado puede comprender una cadena alfa o beta o una cadena gamma y delta, al menos un dominio variable.

El receptor de células T comprende preferentemente al menos un dominio constante y/o al menos un dominio variable de un receptor de célula T o una parte del mismo.

Otro receptor de células T preferido consiste en un dominio de una cadena alfa, beta, gamma, o delta, o una parte del mismo, con al menos dos regiones bucle estructurales, y se caracteriza porque al menos dichas dos regiones bucle estructurales comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos que forman al menos dos regiones bucle estructurales modificadas, donde dichas al menos dos regiones bucle estructurales modificadas se unen específicamente al menos a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la unión específica del polipéptido del dominio del receptor de células T modificado a una molécula se determina por un ensayo de unión que se selecciona de entre el grupo que consiste en ensayos inmunológicos, preferiblemente ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmones superficiales, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de transferencia NOE (tNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión en tejidos, ensayos de unión en células vivas, ensayos de unión celular y ensayos en extractos celulares.

Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo utilizando varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a ensayos basados en FRET (Resonancia de fluorescencia de transferencia de energía) y BRET (Resonancia de Bioluminiscencia de transferencia de energía), Ensayo homogéneo de proximidad de luminiscencia amplificada, Ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), SPR (Resonancia de plasmones superficiales), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de rastreo diferencial, electroforesis en gel, y cromatografía que incluye la filtración en gel.

El polipéptido modificado se conjuga preferentemente con un marcador que se selecciona de entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores de color, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, oro coloidal y mezclas de los mismos.

El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede conjugar con otras moléculas que permitan la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

También se describe en el presente documento un polipéptido que comprende un dominio de un receptor de células T o combinaciones de los mismos, con al menos dos regiones bucle estructurales, que se caracterizan por que dichas al menos dos regiones bucle estructurales comprenden cada una al menos una modificación de aminoácidos que forman al menos dos regiones bucle estructurales, en las que dichas al menos dos regiones bucle estructurales modificadas se unen específicamente a al menos un epítipo de un antígeno.

Se prefiere combinar molecularmente al menos un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado (=

que se une a la pareja de unión específica por medio de las secuencias no variables o bucles estructurales) con al menos otra molécula de unión que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro polipéptido del dominio del receptor de células T modificado.

- 5 La otra molécula de unión combinada con el al menos un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se selecciona de entre el grupo que consiste en moléculas proteínicas, ácidos nucleicos, y carbohidratos.

10 Las regiones bucle estructurales de los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden unir específicamente a cualquier clase de moléculas de unión, en particular a moléculas proteínicas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glucanos, carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas pequeñas y grandes, moléculas inorgánicas. Por supuesto, el polipéptido del dominio del receptor de células T modificado puede comprender al menos dos regiones bucle de manera que cada una de las regiones bucle se puede unir específicamente a diferentes moléculas o epitopos.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación la molécula de unión a la región bucle estructural modificada se selecciona de entre el grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, en particular EpCAM, glucoproteína-72 asociada a tumores (TAG-72), antígeno CA 125, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), carbohidrato relacionado con el antígeno que expresa Lewis Y asociado a tumores, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno citoqueratina asociado a tumores, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, moléculas de IgE relacionadas con alergia, cKIT y receptor I Fc-epsilon, IRp60, receptor de IL-5, CCR3, receptor celular de glóbulos rojos (CR1), seroalbúmina humana, seroalbúmina de ratón, seroalbúmina de rata, receptor Fc gamma neonatal FcRn, Receptores Fc gamma Fc gamma RI, Fc gamma-RII, Fc gamma RIII, receptores Fc alfa, receptores Fc epsilon, fluoresceína, lisozima, receptor 9 tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD10, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; FGF20, TNF alfa, TNF beta 2, TNF alfa, TNF alfa beta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, Receptor 1 TRAIL, receptor A1 de adenosina, Receptor beta de linfotóxina, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta 2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa 2, integrina alfa 3, integrina alfa 4, integrina alfa 5, integrina alfa 6, integrina alfa v, integrina alfaVbeta 3, FGFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, VLA-1, VLA-5, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, integrina VNR, TGF beta 1, TGF beta 2, eotaxina 1, BlyS (Estimulador de linfocitos B), complemento C5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, factor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her-3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelina, VLA-4, carbohidratos tales como los antígenos de grupo sanguíneo y carbohidratos relacionados, Galililglicosilación, Gastrina, receptores de Gastrina, carbohidratos asociados a tumores, Hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor de células T alfa/beta, E-selectina, P-glucoproteína, MRP3, MRP5, glutatión-S-transferasa (proteínas de resistencia multifármaco), proteína de membrana granular alfa (GMP) 140, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina tipo PLAP testicular, receptor de transferrina, Heparanasa I, miosina cardíaca humana, Glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glucoproteína de envoltura gH de citomegalovirus humano (HCMV), HIV gp120, HCMV, virus sincitial respiratorio RSV F, RSVF Fgp, integrina VNR, Hep B gp 120, CMV, gp11bLIIa, bucle HIV IIIB gp 120 V3, Fgp del virus sincitial humano (RSV), glucoproteína gD del virus del herpes simple (HSV), glucoproteína gB HSV, glucoproteína de la envoltura gB del HCMV, toxina de Clostridium perfringens y fragmentos de los mismos.

50 Preferentemente, el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en antígeno patógeno, antígeno asociado a tumores, enzimas, sustratos, auto-antígenos, moléculas orgánicas o alérgenos. Los antígenos más preferidos se seleccionan de entre el grupo que consiste en antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos de patógenos de eucariotas o fagos. Los antígenos víricos preferidos incluyen HAV, HBV, HCV, HIV I, HIV II, Parvovirus, Influenza, HSV-, virus de la hepatitis, Flavivirus, Virus del Nilo Occidental, virus del ébola, virus de viruela, virus de influenza menor, virus de sarampión, virus del herpes, adenovirus, virus del papiloma, virus polioma, parvovirus, rinovirus, virus Coxackie, virus de polio, echovirus, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, virus de La Crosse, virus Lassa, virus de la rabia, antígenos de rotavirus; los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos de Pseudomonas, Mycobacterium, Staphylococcus, Salmonella, Meningococcus, Borrelia, Listeria, Neisseria, Clostridium, Escherichia, Legionella, Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Moraxella, Brúcela, Campylobacter, Cardiobacterium, Francisella, Helicobacter, Haemophilus, Klebsiella, Shigella, Yersinia, Vibrio, Chlamydia, Leptospira, Rickettsia, Mycobacterium, Treponema, Bartonella. Los antígenos de eucariotas preferidos de eucariotas patógenas incluyen antígenos de Giardia, Toxoplasma, Cyclospora, Cryptosporidium, Trichinella, levaduras, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides.

65 El polipéptido del dominio del receptor de células T modificado se puede unir preferentemente a una de las moléculas desveladas anteriormente. Estas moléculas comprenden también alérgenos. El polipéptido modificado puede conjugarse preferentemente a un marcador o una molécula indicadora que se

selecciona de entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores de color, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos.

5 Los polipéptidos modificados conjugados con marcadores como se ha especificado anteriormente se pueden utilizar, por ejemplo, en métodos de diagnóstico.

10 También se describen en el presente documento el uso de un polipéptido del dominio del receptor de células T que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención para la preparación de una vacuna para la inmunización activa. De esta manera el polipéptido del dominio del receptor de células T se usa o como sustancia fármaco antigénica para formular una vacuna o se usa para pescar o capturar estructuras antigénicas para su uso en una formulación vacunal.

15 También se describe en el presente documento el uso de un polipéptido del dominio del receptor de células T que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención para la preparación de una biblioteca proteica de moléculas que comprende polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados.

20 También se describe en el presente documento un método para unirse específicamente y/o detectar una molécula diana que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una molécula que comprende un polipéptido del dominio 41 del receptor de células T modificado que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención con una muestra de ensayo sospechosa de contener dicha molécula diana, y
- 25 (b) detectar la formación potencial de un complejo polipéptido del dominio del receptor de células T específico/molécula diana.

También se describe en el presente documento un método para aislar específicamente una molécula diana que comprende las etapas de:

- 30 (a) poner en contacto una molécula que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención con una muestra de ensayo que contiene dicha molécula diana,
- (b) separar el complejo polipéptido del dominio del receptor de células T específico/molécula diana que se forma,
- 35 y
- (c) aislar opcionalmente la molécula diana de dicho complejo.

40 Los polipéptidos del dominio del receptor de células T se puede utilizar para aislar específicamente moléculas diana de una muestra. Si se utilizan polipéptidos del dominio del receptor de células T multiespecíficos se pueden aislar más de una molécula diana de una muestra. Es especialmente ventajoso el uso de polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados en tales métodos debido a que permite, por ejemplo, generar una matriz que tienen una superficie homogénea con cantidades definidas de las parejas de unión (es decir, polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados) inmovilizados en ella que son capaces de unirse a las moléculas diana que se van a aislar. Por el contrario, si se utilizan parejas de unión monoespecíficas se puede generar una matriz no homogénea debido a que las parejas de unión sencillas no se unen con la misma eficacia a la matriz.

45 También se describe en el presente documento un método para dirigir un compuesto a una diana, que comprende las etapas de:

- 50 (a) poner en contacto una molécula que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado o una molécula que comprende un polipéptidos del dominio del receptor de células T modificado que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención capaz de unirse específicamente a dicho compuesto.
- (b) suministrar la molécula que comprende un complejo polipéptido del dominio del receptor de células T/compuesto a la diana.

55 Los polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados se pueden utilizar para suministrar al menos un compuesto unido a las CDR y/o regiones bucle estructurales modificadas a una diana. Tales receptores de células T modificados se pueden utilizar para dirigir sustancias terapéuticas a un sitio preferido de acción en el curso del tratamiento de una enfermedad.

60 También se describe en el presente documento una biblioteca de moléculas que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T de acuerdo con la presente invención o que se obtiene por el método de acuerdo con la presente invención.

65

Los métodos preferidos para la construcción de dicha biblioteca se pueden describir en el presente documento, se encuentran anteriormente y en los ejemplos. La biblioteca descrita en el presente documento se puede utilizar para identificar polipéptidos del dominio del receptor de células T unidos a distintas moléculas.

5 Se describe en el presente documento el uso de una biblioteca de polipéptidos que comprenden un polipéptido del dominio del receptor de células T que se obtiene por el método de acuerdo con la presente invención para el diseño de derivados del receptor de células T.

Un receptor de células T existente puede cambiarse para introducir sitios de unión al antígeno en un dominio utilizando una biblioteca de proteínas de los respectivos dominios modificados tipo silvestre de al menos 10, 10 preferentemente 100, más preferentemente 1000, más preferentemente 10000, más preferentemente 100000, más 15 preferentemente más de 1000000 variantes de dominios cada uno con al menos un bucle estructural modificado. Preferentemente las variantes de dominios comprenden al menos dos bucles estructurales. La biblioteca se selecciona entonces por la unión al antígeno específico. Tras la caracterización molecular de las propiedades deseadas el dominio seleccionado se clona en el receptor de células T original por técnicas de modificación genética de forma que se remplace la región tipo silvestre. De manera alternativa, puede cambiarse solo el ADN que codifica 20 los bucles estructurales modificados o que codifica los aminoácidos mutados para obtener un receptor de células T con el sitio de unión adicional para el antígeno específico. De manera alternativa, la modificación de los bucles estructurales de los dominios se pueden llevar a cabo con el dominio en su contexto natural, por ejemplo, en forma de un receptor de células T unido a células, un receptor de células T soluble, un TCR de cadena sencilla, un TCR dimerizado en cremallera o una combinación de los mismos con cualquier otra molécula. La ventaja de esta disposición es que la selección se lleva a cabo con modificaciones en su contexto pretendido y por lo tanto cualquier influencia de las modificaciones variadas en la estructura o función del resto de la molécula se observa fácilmente.

La elección del sitio para el bucle estructural específico de antígeno mutado, depende de la estructura del receptor 25 de células T original y el fin del sitio de unión adicional. Si, por ejemplo, el receptor de células T original es un TCR de cadena sencilla, es posible la modificación de bucles estructurales en los dos dominios. Si el receptor de células T original es un TCR soluble con dominios constantes y variables, se pueden modificar los bucles estructurales en un lado de cada dominio variable así como los bucles estructurales en dos lados de cada dominio constante.

30 Para generar una biblioteca se pueden preparar bibliotecas de moléculas originales mutantes que tienen mutaciones en uno o más bucles estructurales de uno o más dominios del receptor de células T. La selección de moléculas originales mutadas completas puede tener algunas ventajas así como la selección por unión al antígeno con un bucle estructural modificado suministrará las modificaciones estéricamente ventajosas. Por ejemplo, si la molécula completa es un TCR de cadena sencilla, puede ser ventajoso seleccionar la biblioteca de TCR de cadena sencilla 35 originales mutados por la unión a un antígeno, seguido por la selección de los enlazadores para la unión del antígeno que se reconoce por los bucles CDR (especificidad original). En un procedimiento de selección alternativo el antígeno original – el primero – se puede unir a los bucles CDR durante la selección por unión a un antígeno con los bucles estructurales modificados. Esta selección simultánea puede permitir la selección preferencial de clones que contienen mutaciones en los bucles estructurales que no afectan negativamente la unión del dominio del receptor de células T a su diana original que reconoce por medio de sus bucles CDR.

Se describe en el presente documento una biblioteca de variantes de polipéptidos del dominio del receptor de 45 células T con al menos una variante en la posición de aminoácidos en al menos uno de los bucles estructurales. La biblioteca puede comprender dominios TCR de la cadena alfa, beta, gamma y delta o mezclas de combinaciones moleculares de las mismas. Más preferentemente la variante de polipéptidos del dominio del receptor de células T de la biblioteca tienen al menos 2, al menos 3, al menos 4 variantes de la posición de aminoácidos en al menos un bucle estructural.

También se describe en el presente documento una biblioteca de TCR de cadena sencilla con al menos una 50 variación en la posición de aminoácidos en al menos uno de los bucles estructurales de cualquiera de los dominios del scTCR.

También se describe en el presente documento una biblioteca de TCR dimerizado en cremallera con al menos una 55 variación en la posición de aminoácidos en al menos uno de los bucles estructurales de cualquiera de los dominios del TCR dimerizado en cremallera de leucina.

También se describe en el presente documento una biblioteca de TCR con al menos una variación de la posición de aminoácidos en al menos uno de los bucles estructurales de cualquiera de los dominios del TCR.

60 También se describe en el presente documento una biblioteca TCR con al menos una variación en la posición de aminoácidos en al menos uno de los bucles estructurales de cualquiera de los dominios de TCR soluble.

Los requisitos de tamaño (es decir, el número de variaciones en proteínas) de una biblioteca de proteína comprenden polipéptidos del dominio del receptor de células T mutados o moléculas de fusión con un polipéptido del dominio del receptor de células T mutado depende de la tarea. En general, una biblioteca para generar un sitio de 65 unión al antígeno de novo necesita ser mayor que una biblioteca que se utiliza para una modificación posterior de un sitio de unión al antígeno ya existente formado por un bucle estructural modificado (por ejemplo, para aumentar la

afinidad o afinar el cambio de especificidad al antígeno).

5 También se describe en el presente documento una biblioteca de polipéptidos o una biblioteca de ácidos nucleicos que comprenden una pluralidad de polipéptidos que comprenden dominios del receptor de células T o al menos una región bucle estructural que está contenida en un minidominio, o moléculas de ácido nucleico que codifican las mismas. La biblioteca contiene miembros con diferentes modificaciones, en los que se define la pluralidad por las modificaciones en al menos una región bucle estructural. La biblioteca de ácidos nucleicos incluye preferentemente al menos 10 miembros diferentes (con al menos una, mas preferentemente al menos dos, incluso más preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro modificaciones potenciales de aminoácidos) y más preferentemente incluye al menos 100, más preferentemente 1000 o 10000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñados por estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). También se prefieren incluso cantidades de miembros individuales más diversificadas, tales como de al menos 1000000 o al menos 10000000.

15 También se describe en el presente documento una combinación de dos polipéptidos del dominio del receptor de células T diferentes que se seleccionan de entre al menos dos bibliotecas con el fin de generar receptores de células T multiespecíficos. Estos polipéptidos del dominio del receptor de células T específicos seleccionados se pueden combinar entre ellos con otras moléculas, al igual que bloques de construcción, para diseñar la disposición óptima de los dominios para conseguir las propiedades deseadas tales como combinaciones de especificidades y/o valencias.

20 Además, se pueden introducir uno o más polipéptidos del dominio del receptor de células T modificados en varios o todos los sitios diferentes de una proteína sin la destrucción de la estructura de la proteína. Por tal técnica de "barajado de dominios" se crean nuevas bibliotecas que se pueden seleccionar de nuevo por las propiedades deseadas.

25 La biblioteca preferida contiene polipéptidos del dominio del receptor de células T de acuerdo con la invención o derivados de los mismos.

30 Se describe en el presente documento una molécula de unión para un antígeno (molécula de unión al antígeno) que comprende al menos un polipéptido del dominio del receptor de células T y al menos una región bucle estructural del mismo que se ha modificado de acuerdo con la presente invención para unirse al antígeno, en que dicha molécula de unión no tiene actividad relevante y/o específica de unión con sus bucles CDR; sin embargo tiene una actividad de unión nueva introducida en la región bucle estructural.

35 También se prefiere para las moléculas de unión al antígeno que los nuevos sitios de unión al antígeno en los bucles estructurales se introduzcan por técnicas de aleatorización, es decir, modificando uno o más restos de aminoácidos de al menos dos bucles estructurales por técnicas de aleatorización o por introducción aleatoria de las inserciones generadas en tales bucles estructurales. De manera alternativa se prefiere el uso de estrategias combinatorias.

40 También se describe en el presente documento un receptor de células T que tiene un sitio de unión al antígeno ajeno al receptor de células T sin modificar y que se incorpora en uno, dos, tres o más bucles estructurales de al menos un dominio. El término "ajeno" significa que el sitio de unión al antígeno no se forma naturalmente por las regiones de bucle estructural específicas del dominio del receptor de células T.

45 También se describe en el presente documento un receptor de células T modificado que tiene un sitio de unión al antígeno ajeno a un receptor de células T sin modificar y que está incorporado en uno, dos, tres o más bucles estructurales de al menos un dominio, en que dicho receptor de células T modificado ese una a dicho antígeno con una afinidad de al menos 10^3 mol^{-1} , al menos 10^4 mol^{-1} , al menos 10^5 mol^{-1} , al menos 10^6 mol^{-1} , al menos 10^7 mol^{-3} , al menos 10^8 mol^{-1} , o al menos 10^9 mol^{-1} .

50 Los polipéptidos del dominio del receptor de células T preferidos comprenden al menos dos sitios de unión al antígeno, el primer sitio de unión a un primer epítipo, y el segundo sitio de unión a un segundo epítipo.

55 Preferentemente, un polipéptido del dominio del receptor de células T como se describe en el presente documento comprende al menos tres regiones bucle, la primera región bucle que se une al primer epítipo, y la segunda y tercera región bucle que se une a un segundo epítipo. O al menos la primera o al menos la segunda y tercera región bucle o ambas pueden contener un bucle estructural. Los dominios del receptor de células T incluyen los fragmentos de los mismos que se conocen en la técnica por ser funcionales que contienen regiones bucle estructurales modificadas de acuerdo con la presente invención.

60 Preferentemente, el receptor de células T está compuesto por al menos dos dominios de receptor de células T, o una parte de los mismos que incluyen un minidominio, y cada dominio contiene al menos un sitio de unión al antígeno.

65 También se prefiere un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos un dominio de la región variable de un receptor de células T y al menos un dominio de la región constante de un receptor de células

T; por ejemplo, un dominio variable, que está modificado en al menos dos bucles estructurales unidos a un dominio constante.

5 El polipéptido del dominio del receptor de células T preferido comprende un dominio que tiene al menos una homología del 50 % con el dominio sin modificar.

El término "homología" indica que los polipéptidos tienen los mismos restos o se conservan en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos.

10 "Dominio del TCR homólogo" significa un dominio TCR que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 50 % con respecto a una secuencia del dominio matriz del TCR como secuencia de longitud completa o cualquier otro fragmento de una secuencia del dominio del TCR de longitud completa como se desvela en el presente documento. Preferentemente, un dominio TCR homólogo tendrá al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 55 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 60 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 65 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 70 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 85 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 90 %, más preferentemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 95 % respecto a una secuencia del dominio del TCR nativo, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia del dominio TCR de longitud completa como se desvela en el presente documento.

30 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias del dominio del TCR identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticas a los restos de aminoácidos en la secuencia del dominio del TCR específico, tras el alineamiento de la secuencia y la introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, utilizando software de computadora disponible públicamente tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente parámetros para medir el alineamiento que incluye cualquier algoritmo necesario para alcanzar el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se van a comparar.

40 Los valores del % de identidad de secuencia se pueden obtener como se describe posteriormente utilizando el programa de computadora WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda del WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores que no se fijan por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan según los siguientes valores: lapso solapado = 1, fracción solapada = 0,125, umbral de palabra (T) = 11, y puntuación de matriz = BLOSUM62. Cuando se utiliza el WU-BLAST-2, se determina el valor del % de identidad de secuencia de aminoácidos dividiendo (a) el número de coincidencia de restos de aminoácidos idénticos entre la secuencia de aminoácidos del dominio TCR de interés que tiene una secuencia derivada del dominio TCR nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia con la que se está comparando el dominio del TCR de interés que puede ser el dominio del TCR sin modificar) determinada por WU-BLAST-2 por (b) el número total de restos de aminoácidos de las partes no aleatorizadas del dominio del TCR de interés. Por ejemplo, en la declaración "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos X que tiene o al menos tiene una identidad de secuencia del 90 % respecto al aminoácido Y", la secuencia de aminoácidos A es la comparación de la secuencia de aminoácidos de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del dominio del TCR de interés.

55 Un polipéptido descrito en el presente documento, puede ser un receptor de células T o un receptor de células T de cadena sencilla biespecífico o un receptor de células T dimerizado en cremallera biespecífico o un receptor de células T soluble biespecífico. Además se prefiere que el polipéptido comprenda un dominio biespecífico o una parte del mismo.

60 El polipéptido se puede usar para cualquier fin conocido en la técnica para los receptores de células T e inmunoglobulinas pero también hacen posible aplicaciones que dependen de la combinación de especificidades introducidas por la presente invención. En consecuencia los polipéptido se utilizan preferentemente para usos terapéuticos y profilácticos (por ejemplo, como inmunoterapia activa o pasiva, para inmunomodulación); para uso de preparación y analítico y para uso diagnóstico.

65

También se describe en el presente documento un kit de parejas de unión que contiene

- 5 (a) un polipéptido que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado que tiene un sitio de unión al antígeno incorporado en uno o más bucles estructurales, y
 (b) una molécula de unión que contiene un epítipo de dicho antígeno.

10 Tal molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para identificar la especificidad de unión del polipéptido que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado de acuerdo con la presente invención. Utilizando la molécula de unión de este kit, se puede determinar la potencia del polipéptido modificado.

Como se define en el presente documento, potencia es la propiedad de unión de la molécula modificada de la invención a su antígeno. La unión se puede determinar cuantitativa y/o cualitativamente en términos de especificidad y/o afinidad y/o avidéz como se utiliza para los fines de control de calidad.

- 15 Además, la molécula de unión de un kit se puede utilizar para seleccionar el polipéptido que comprende un polipéptido del dominio del receptor de células T modificado de una biblioteca que consiste en al menos 10, preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 1000, más preferido al menos 10000, especialmente al menos 100000 polipéptidos con diferentes modificaciones en los bucles estructurales.

- 20 De acuerdo con la presente invención, una de las características clave de la presente invención es que la modificación de los polipéptidos del dominio del receptor de células T tiene lugar en regiones que normalmente no están implicadas en la unión al antígeno, en otras palabras, en regiones distintas de las CDR de un dominio variable del TCR. Se ha observado que el plegamiento específico de los dominios del receptor de células T permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que son análogas estructuralmente a las CDR pero diferentes en la posición, en la secuencia y estructura. Las regiones identificadas son, como las CDR, regiones bucle que conectan las cadenas beta del plegamiento de inmunoglobulina del polipéptido del dominio del receptor de células T. Estas regiones bucle estructurales se pueden mutar como se ha descrito sin afectar la unión de los dominios del receptor de células T que están mediadas por los bucles CDR. Mutando dichas regiones bucle estructurales, se puede generar una superficie de unión molecular nueva o un bolsillo de unión que es similar en tamaño y forma a la superficie de unión o bolsillo de unión formado por los bucles CDR del sitio de unión al antígeno natural de un receptor de células T. Como los bucles estructurales también se pueden extender por la inserción de aminoácidos adicionales, la arquitectura del sitio de unión generado de nuevo se puede ajustar a la diana a la que se debería unir. Por ejemplo, los bolsillos de unión profundos que son especialmente adecuados para unirse a moléculas pequeñas se pueden formar preferencialmente por bucles largos, es decir, bucles estructurales con aminoácidos adicionales insertados en su secuencia, mientras que más bien se forman preferencialmente superficies de unión planas, que se adecúan bien para unirse a dianas con una superficie molecular larga, plana cuando los restos en los bucles estructurales se mutan sin la inserción de restos adicionales.

- 40 Más específicamente, se describe en el presente documento que introduciendo mutaciones aleatorias o semi-aleatorias en los bucles que conectan las cadenas beta A-B, C'-D y E-F del dominio variable del TCR humanizado, se pueden seleccionar los dominios mutados que se unen específicamente o bien a la seroalbúmina humana o a los receptores Fc, los cuales no los reconocen normalmente ni se unen los dominios del TCR humanos. Las mutaciones introducidas incluyen las mutaciones en las que los restos de aminoácidos seleccionados en la secuencia tipo silvestre se reemplazaron por restos elegidos aleatoriamente, y también incluyen las inserciones de restos de aminoácidos extras en los bucles mencionados anteriormente.

- 50 Por analogía, los dominios de cualquier clase de receptores de células T y de receptores de células T de cualquier especie son susceptibles para este tipo de modificación. Además no solo se pueden modificar los bucles específicos dirigidos en los ejemplos de la presente invención, sino que se puede modificar cualquier bucle estructural que conecta cadenas beta en los dominios del receptor de células T de la misma manera.

- Los dominios del receptor de células T de cualquier organismo y de cualquier clase se pueden utilizar o como tal (como dominios sencillos), o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de un receptor de células T intacto, que en consecuencia tendría su región de unión al antígeno "normal" formada por 6 CDR y la región de unión al antígeno nueva, modificada. Así, se podría generar un receptor de células T multiespecífico, por ejemplo, biespecífico. Los dominios del receptor de células T modificados pueden ser parte también de cualquier proteína de fusión. El uso de estos dominios del receptor de células T es en el campo general del uso de receptores de células T e inmunoglobulinas.

- 60 Los siguientes ejemplos explicarán la presente invención con más detalle, sin embargo, sin restringirla.

Ejemplos

Ejemplo 1

65

ES 2 531 515 T3

Se construyen varias bibliotecas diferentes basándose en una versión soluble del 1G4 TCR, que es específico para el epítipo NY-ESO (documento WO02005113595).

5 La biblioteca de genes se ensambla a partir de oligonucleótidos sintéticos específicos y se clonan como cadenas alfa y beta de TCR de longitud completa que se presenta sobre un fago filamentosos. La cadena alfa se expresa en un formato soluble, y la cadena beta se expresa como fusión en fase al gen III de la proteína de envoltura del bacteriófago M13. La cadena alfa tiene un resto cisteína no nativo (codificado por la mutación Thr84Cys (numeración IMGT)) y la cadena beta tiene un resto cisteína no nativo (codificado por la mutación Ser79Cys (numeración IMGT)) que permite la formación de heterodímeros. La clonación, selección y caracterización se puede hacer como se describe en Li et al. (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354. El siguiente gen 1G4 TCR y pares de la biblioteca genética se clonan en el vector fago de presentación de tres cistrones, pEX746 esencialmente como se describe en Li et al. (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354.

- 15 (a) gen 1G4 de la cadena alfa de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-1 V-beta
- (b) gen 1G4 de la cadena alfa de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-2 V-beta
- (c) gen 1G4 de la cadena alfa de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-1 C-beta
- (d) gen 1G4 de la cadena alfa de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-2 C-beta
- (e) gen 1G4 de la cadena beta de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-1 V-alfa
- 20 (f) gen 1G4 de la cadena beta de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-2 V-alfa
- (g) gen 1G4 de la cadena beta de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-1 C-alfa
- (h) gen 1G4 de la cadena beta de tipo silvestre en combinación con la biblioteca genética 1G4-2 C-alfa

25 A continuación están las secuencias para las cadenas 1G4 tipo silvestre y para las bibliotecas en ambas cadena alfa y cadena beta, con dominios variables y constantes que se aleatorizan para cadena por separado. Se dan para cada V alfa, C alfa, V beta, y C beta, dos bibliotecas: una con sustituciones solo, una con inserciones adicionales. Esto significa que se describen un total de 8 bibliotecas a continuación.

30 Gen de la cadena alfa 1G4 tipo salvaje, nº de registro Genbank nº CS230225 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

```
1   ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA
    AAAC TTGGTT TCAACTGCA GTTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT
    CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAAGTGA AACTTAATG CCTCGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG
    ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTCATC CGTATATCCA
    GAACCCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
401 AGTCTGTCTG CCTATTACAC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA
    AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGCTGT GGCCTGGAGC AACAAATCTG
    ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
601 TTCTTCCCA GCCAGAAAG TTCCTAA
```

35 Proteína de cadena alfa 1G4 tipo silvestre, nº de registro Genbank CS230225 (incluyendo codón de inicio y codón de parada):

```
MQEV TQIP AALSV PEGEN LVLNCS FTDS AIYNLQWFR QDPGKGLT SLLLIQSS QREQTS GRLNA
SLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFN
NSIIPEDTFFPSPSS#
```

ES 2 531 515 T3

Gen de la biblioteca V-alfa 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

```

1   ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CANNNSNNSNN
    SNNSTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT
    CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAGTGGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TNNSNNSNNS NNSCCTGGTG
    ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA
    GAACCCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
401 AGTCTGTCTG CCTATTCACC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA
    AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGCTGT GGCCTGGAGC AACAAATCTG
    ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
601 TTCTTCCCCA GCCCAGAAAG TTCCTAA

```

5

Proteína de biblioteca V-alfa 1G4 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

```

MQEVTOI PAALSVPXXXXLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLLIQSSQREOTSGRLNA
SLDKSSGRSTLYIXXXXPGDSATYLCVVRPTSGGSYIPTFGRGISLIVHPYIQNPDFAVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFN
NSIIPEDTFFPSPSS#

```

10 Restos mutados:

```

EGEN 15-18
AASQ 92-95

```

15 Gen de biblioteca V-alfa 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

```

1   ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CANNNSNNSNN
    SNNSTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT
    CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAGTNNS NNSNNSAATG CCTCGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TNNSNNSNNS NNSCCTGGTG
    ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA
    GAACCCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
401 AGTCTGTCTG CCTATTCACC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA
    AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG

```

ES 2 531 515 T3

501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGCTGT GGCCTGGAGC AACAAATCTG
ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
601 TTCTTCCCCA GCCCAGAAAG TTCCTAA

Proteína de biblioteca V-alfa 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

MQEVTTQIPAAALSVXXXXLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSXXXNA
SLDKSSGRSTLYIXXXXPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDPVAVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFN
5 NSIIPEDTFFPSPESS#

Restos mutados

10 EGEN 15-18
GRL 70, 78,79
AASQ 92-95
Gen de biblioteca C-alfa 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada).

Secuencia de ADN con traducción:

15
1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA
AAACTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT
CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAGTGGGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG
ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA
GAACCCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
401 AGTCTGTCTG CCTATTCACC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA
AGTNNSNNSN NSNNSGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGCTGT GGCCTGGAGC NNSNNSNNSN
NSTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
601 TTCTTCCCCA GCCCAGAAAG TTCCTAA

Proteína de biblioteca C-alfa 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada)

20 MQEVTTQIPAAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNA
SLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDPVAVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSXXXXVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSXXXXFACANAFN
NSIIPEDTFFPSPESS#

Restos mutados:

25 KSDS 43-77
NKSD 91-101

ES 2 531 515 T3

Gen de biblioteca C-alfa 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada).

```
1   ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA
    AAACTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT
    CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAGTGGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG
    ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA
    GAACCCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
401 AGTCTGTCTG CCTATTCACC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA
    AGTNNSNNSN NSNNSNNSGT GTATATCACA GACAAATGTG TGCTAGACAT
501 GAGGTCTATG GACTTCAAGA GCAACAGTGC TGTGGCCTGG AGCNNSNNSN
    NSNNSNNSTT TGCATGTGCA AACGCCTTCA ACAACAGCAT TATTCCAGAA
601 GACACCTTCT TCCCCAGCCC AGAAAGTTCC TAA
```

5 Proteína de biblioteca C-alfa 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

```
MQEVTVQIPAAHSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRINA
SLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDPVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSXXXXXVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSXXXXXFACANA
FNNSIIPEDTFFPSPESS#
```

Restos mutados:

10

Restos insertados "X"
KDSXD
NKSXD

15

Gen de V-beta 1G4 tipo silvestre, nº de Registro GenBank CS230226 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

ES 2 531 515 T3

1 atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag
 catgacactg
 61 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga
 cccaggcatg
 121 gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggatca ctgaccaagg
 agaagtcccc
 181 aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct
 gctgtcggct
 241 gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa
 caccggggag
 301 ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaa
 cgtgttccca
 361 cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca
 aaaggccaca
 421 ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg
 gtgggtgaat
 481 ggggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc ccctcaagga
 gcagcccgcc
 541 ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac
 cttctggcag
 601 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga
 gaatgacgag
 661 tggaccagc atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc
 ctggggtaga
 721 gcagactaa

Proteína de V-beta 1G4 tipo silvestre, nº de registro GenBank CS230226 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

5 MGVTQT PKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVFNNGYN
 VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
 SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRL
 RVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRAD#

Gen de biblioteca V-beta 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

10

ES 2 531 515 T3

1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCTGNNSN NSNNSNNSNN
SATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCCTGGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT
GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGCTACA ATGTCTCCAG
201 ATCAACCACA GAGGATTTCC CGCTCAGGCT GNNSNNSNNS NNSCCCTCCC
AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA
CGTGTGCCCA CCCGAGGTCG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGATCT
401 CCCACACCCA AAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC
GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGAAGGAGG TGCACAGTGG
501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT
CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCTCGGCCAC CTTCTGGCAG
601 GACCCCGCA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTTCTACG GGCTCTCGGA
GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACC CAGATCGTCA
701 GCGCCGAGGC CTGGGGTAGA GCAGACTAA

Proteína de la biblioteca V-beta 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

MGVTQTPKFQVLXXXXXMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN
VSRSTTEDFPLRLXXXXPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRL
RVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

5

Restos mutados:

KTGQS 15-18.
LSAA 92-95

10

Gen de biblioteca V-beta 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada).

ES 2 531 515 T3

1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCTGNNSN NSNNSNNSN
SATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCCTGGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT
GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATNNSTACN NSNNSTCCAG
201 ATCAACCACA GAGGATTTCC CGCTCAGGCT GNNNSNNSNS NNSCCCTCCC
AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA
CGTGTTCCTCA CCCGAGGTCG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGATCT
401 CCCACACCCA AAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC
GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGAAGGAGG TGCACAGTGG
501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT
CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCTCGGCCAC CTTCTGGCAG
601 GACCCCGCA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTTCTACG GGCTCTCGGA
GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACC CAGATCGTCA
701 GCGCCGAGGC CTGGGGTAGA GCAGACTAA

Proteína de la biblioteca V-beta 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

MGVTQTPKFQVLXXXXXMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVFNXYX
XSRSTTEDFPLRLXXXXPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRL
5 RVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

Restos mutados:

10 KTGQS 15-18
G, N, V 75, 77, 78
LSAA 92-95

Gen de la biblioteca C-beta 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCTGAAGA CAGGACAGAG
CATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCCTGGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT
GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGCTACA ATGTCTCCAG

15

ES 2 531 515 T3

201 ATCAACCACA GAGGATTTCC CGCTCAGGCT GCTGTCGGCT GCTCCCTCCC
 AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
 301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA
 CGTGTTCCCA CCCGAGGTCG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGNNSN
 401 NSNNSNNSNN SAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC
 GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGAAGGAGG TGCACAGTGG
 501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT
 CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCNNSNNSNN SNNSTGGNNS
 601 GACCCCGCA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTCTACG GGCTCTCGGA
 GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACC CAGATCGTCA
 701 GCGCCGAGGC CTGGGGTAGA GCAGACTAA

Gen de la biblioteca C-beta 1G4-1 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

MGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN
 VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
 SEAXXXXXXXXKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRL
 5 RVXXXXWXDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRAD

Restos mutados:

ISHTQ 14, 15, 15.1, 16, 17
 SATFQ 92-95, 96.1

Gen de la biblioteca C-beta 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada).

1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCTGAAGA CAGGACAGAG
 CATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCCTGGT
 101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT
 GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGCTACA ATGTCTCCAG
 201 ATCAACCACA GAGGATTTCC CGCTCAGGCT GCTGTCGGCT GCTCCCTCCC
 AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
 301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA
 CGTGTTCCCA CCCGAGGTCG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGNNSN

401 NSNNSNNSNN SNNSAAGGCC ACACTGGTGT GCCTGGCCAC AGGCTTCTAC
 CCCGACCACG TGGAGCTGAG CTGGTGGGTG AATGGGAAGG AGGTGCACAG
 501 TGGGGTCTGC ACAGACCCGC AGCCCCTCAA GGAGCAGCCC GCCCTCAATG
 ACTCCAGATA CGCTCTGAGC AGCCGCCTGA GGGTCNSNNSNN SNNNSNNS
 601 TGGNSGACC CCCGCAACCA CTCCGCTGT CAAGTCCAGT TCTACGGGCT
 CTCGGAGAAT GACGAGTGA CCCAGGATAG GGCCAAACCC GTCACCCAGA
 701 TCGTCAGCGC CGAGGCCTGG GGTAGAGCAG ACTAA

Proteína de biblioteca C-beta 1G4-2 (incluyendo el codón de inicio y el codón de parada):

MGVTQTPKFQVLKGTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN
 VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
 SEAEXXXXXXXXKATLVCLATGFYPDHVELS~~WW~~VNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSR
 5 LRVXXXXXXXXWDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRAD

Restos mutados:

10 Restos insertados "X"
 ISHTQ 14, 15, 15.1, 16, 17
 SATXFQ 92-95, 96.1

Ejemplo 2

15 Tras la unión de las inserciones de la biblioteca en el vector, se llevaron a cabo las etapas de preparación del fago siguiendo los protocolos de referencia. En resumen, las mezclas de unión se transformaron en células de *E. coli* TGJ por electroporación. Posteriormente, se rescataron las partículas fagos de las células de *E. coli* TG1 con el fago auxiliar M13-KO7. Entonces se precipitaron las partículas fagos del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en dos etapas, se disolvieron en agua y se utilizaron para la selección por panning o, de manera alternativa se almacenaron a menos 80 °C.
 20

Selección de clones que se unen específicamente a la seroalbúmina humana:

25 Las bibliotecas que se han descrito en el ejemplo 1 se utilizan en rondas de panning para el aislamiento de clones de unión específicos siguiendo protocolos de referencia. En resumen, las bibliotecas de fagos se suspenden en tampón de unión (PBS, 1 % de ovoalbúmina, 0,005 % de Tween 20) y se seleccionaron contra seroalbúmina humana inmovilizada directamente en placas maxisorp (10 microgramos/ml en PBS, durante una noche a 4 °C; las placas se bloquearon con Caseína Bloqueante (Pierce). Tras dos horas, los fagos no unidos se retiran por lavado repetitivo (PBS, 0,05 % de Tween 20) y los fagos unidos se eluyen con KCl 500 mM, 10 mM de HCl, pH 2. Se
 30 llevaron a cabo 2, 3, 4 o 5 de tales rondas de panning. Tras cada ronda de panning sobre seroalbúmina humana, se seleccionaron o ensayaron los clones resultantes por su unión a la seroalbúmina humana.

Selección de clones que se unen específicamente a FcRn:

35 Se lleva a cabo el panning como se ha descrito en el documento WO02060919, Ejemplo 6.2. En resumen, las bibliotecas de fagos se resuspendieron en 5 ml de MES 20 mM, pH 6,0/5 % de leche desnatada/0,05 % de Tween 20 y se añadieron (100 microlitros de 5×10^{12} UFP/ml/pocillo) en 20 pocillos de una inmunoplaaca Maxisorp (Nunc) revestida previamente con 1 microgramo de FcRn murino y bloqueada con un 5 % de leche desnatada. Tras la incubación durante 2 h a 37 °C, se lavaron los pocillos 10-30 veces con 20 mM de MES, pH 6,0/0,2 % Tween 20/0,3
 40 M de NaCl y se eluyeron los fagos por incubación en 100 microlitros de PBS, pH 7,4/pocillo durante 30 min a 37 °C. Los fagos se utilizaron para reinfectar exponencialmente las *E. coli* TG1 en cultivo. Se llevaron a cabo 2, 3, 4, o 5 de tales rondas de panning.
 Tras cada ronda de panning sobre FcRn se seleccionan o ensayan los clones resultantes en cuanto a su unión a FcRn.
 45

Selección de clones que se unen específicamente a receptores Fc-gamma:

5 Se llevó a cabo el panning contra Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB y Fc-gammaRIIIB como se describe en Berntzen et al (2006) Protein Eng Des Sel 19:121-128. En resumen, las células cultivadas que se habían
10 transfectado con los genes que codifican Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB o Fc-gammaRIIIB se utilizaron como dianas para la selección de bibliotecas de fagos. Las células que expresan naturalmente Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB o Fc-gammaRIIIB también se pueden utilizar para este fin. Por ejemplo, la línea celular U937 (Colección Americana de Cultivos Tipo CRL-1503) que expresan constitutivamente FcgRI, FcgRIIA y FcgRIIB se puede utilizar como diana. El nivel de FcgRI puede regularse positivamente en esta línea
15 celular por la estimulación del IFN-g, haciendo este receptor el más abundante de los FcgR. Las versiones solubles de los receptores, que se pueden producir en bacterias, levaduras o células animales de manera recombinante también se pueden utilizar para este fin.

Tras cada ronda de panning en Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB o Fc-gammaRIIIB los clones
15 resultantes se seleccionan o ensayan en cuanto a la unión al respectivo receptor, por ejemplo, por ELISA o citometría de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende una región bucle estructural para introducir un nuevo sitio de unión al antígeno en dicha región bucle estructural, en que el bucle estructural no es un bucle CDR, y determinando la unión a un epítipo de dicho antígeno, en que el polipéptido del dominio del receptor de células T sin modificar no se une significativamente a dicho epítipo de dicho antígeno, que comprende las etapas de:
- proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio del receptor de células T que comprende al menos una región bucle estructural.
 - modificar al menos un resto de nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucle estructural por mutación aleatoria dirigida al sitio, en donde se intercambian o introducen dos o más restos de aminoácido específicos de los bucles utilizando insertos generados aleatoriamente en tales bucles estructurales,
 - transferir dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
 - expresar dicho polipéptido del dominio del receptor de células T modificado,
 - poner en contacto el polipéptido del dominio del receptor de células T expresado con dicho epítipo, y
 - determinar si dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se une a dicho epítipo.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido del dominio del receptor de células T se une específicamente a al menos dos epítipos.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **que se caracteriza por que** el polipéptido del dominio del receptor de células T es de origen humano o murino.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **que se caracteriza por que** el polipéptido del dominio del receptor de células T se deriva de un dominio del receptor de células T que se selecciona de entre el dominio variable o constante, preferentemente de entre el grupo que consiste en V-alfa, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alfa, C-beta, C-gamma, C-delta.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **que se caracteriza por que** las regiones bucle modificadas de los dominios variables comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 11 a 19, aminoácidos 43 a 51, aminoácido 67 a 80 o aminoácidos 90 a 99, en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos de los dominios es la del esquema de numeración ImMunoGeneTics (IMGT).
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **que se caracteriza por que** las regiones bucle modificadas de los dominios constantes comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 9 a 20, aminoácidos 27 a 36, aminoácidos 41 a 78, aminoácidos 82 a 85, aminoácidos 90 a 102 o aminoácidos 107 a 116, en donde la numeración de la posición de aminoácidos de los dominios es la del esquema de numeración IMGT.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **que se caracteriza por que** la modificación de al menos un nucleótido de un ácido nucleico da como resultado una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos del polipéptido del dominio del receptor de células T codificado por dicho ácido nucleico.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **que se caracteriza por que** al menos un aminoácido de al menos una región bucle estructural está modificada por una mutación aleatoria dirigida al sitio.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, **que se caracteriza por que** la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente comprende al menos una unidad de repetición de nucleótido que tiene la secuencia codificante NNS, NNN, NNK, TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, en donde la codificación es según la IUPAC.