

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 224**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2004 E 04805928 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 1692172**

54 Título: **Receptor de células T específico para el antígeno tumoral de Wilms**

30 Prioridad:

06.12.2003 GB 0328363

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

20.04.2015

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
52 Princes Gate, South Kensington
London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es:

**STAUSS, HANS JOSEF;
GAO, LIQUAN y
XUE, SHAO-AN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 224 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptor de células T específico para el antígeno tumoral de Wilms

5 La presente invención se refiere a moléculas terapéuticamente útiles, en particular a receptores de células T (RCT) que pueden introducirse en células T del propio paciente con el fin de conducir a las células T a eliminar las células cancerosas del paciente, particularmente células cancerosas que expresan el antígeno tumoral de Wilms 1 (WT1).

10 El listado o análisis de un documento publicado anteriormente en esta memoria descriptiva no debe considerarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es un conocimiento común general. Todos los documentos mencionados en esta memoria descriptiva se incorporan por la presente mediante referencia.

15 Existen pruebas de que los linfocitos T citotóxicos (LTC) antitumorales juegan un papel importante *in vivo*. Se ha mostrado que los LTC reactivos frente a tumores intervienen en la regresión tumoral en modelos animales (Kast *et al* (1989) Cell 59, 603-614) y en seres humanos (Kawakami *et al* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 6458-6462; (2002) Science 298: 850-854). Al igual que con todos los tipos de terapia antitumoral, un problema que ha de superarse es que la terapia debe destruir o inactivar a las células tumorales hasta un grado útil pero que la terapia no debe destruir o inactivar a células no tumorales hasta un grado perjudicial. En otras palabras, es deseable que la
20 terapia sea selectiva para células tumorales a un grado beneficioso.

25 Gran parte del trabajo actual en inmunoterapia del cáncer se basa en que determinados tumores expresan polipéptidos que no se expresan en el tejido no tumoral equivalente o se basan en que el tumor expresa una forma mutante de un polipéptido que no se expresa en el tejido no tumoral. Sin embargo, no siempre es posible identificar polipéptidos en un tumor que entren dentro de esta categoría, y por ello se han identificado otros polipéptidos diana que pueden formar la base de un enfoque inmunoterapéutico.

30 En adultos, la expresión del WT1, un factor de transcripción embrionario, se ha observado en podocitos renales, en el testículo, en el ovario, en células mioepiteliales de mama y en algunas células madre CD34⁺ de la médula ósea. La expresión aberrante se observó en cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, sarcoma y leucemia incluyendo LMC y LMA (véase, por ejemplo, Menssen *et al* (1995) Leukaemia 9, 1060-1067; Inoue *et al* (1997) Blood 89, 1405-1412; Inoue
35 *et al* (1996) Blood 88, 2267-2278; Inoue *et al* (1998) Blood 91, 2969-2976; Menssen *et al* (1997) Leukaemia 70, 518-523; Menssen *et al* (1995) Leukaemia 9, 1060-1067; Ogawa *et al* (1998) Transplant 21, 527-527; Rodeck *et al* (1994) Int. J. Cancer 59, 78-82; Silberstein *et al* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 94: 8132-8137; Inoue *et al* (1996) Blood 88, 4396-4398; Viel *et al* (1994) Int. J. Cancer 57, 515-521; Menssen (2000) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 126, 226-232; Miyoshi (2002) Clin. Cancer Res. 8, 1167-1171; Oji (1999) Jpn J. Cancer Res. 90, 194-204; Oji (2003) Cancer Sci. 94, 523-529; Oji *et al* (2003) Cancer Sci. 94, 606-611; Oji *et al* (2003) Cancer Sci. 94, 712-717; y Ueda (2003) Cance
40 Sci. 94, 271-276.

45 Como se describe en la solicitud de patente WO00/26249, usando un enfoque no convencional que emplea LTC alogénicos restringidos al MHC, se identificaron epítomos peptídicos en el polipéptido WT1 que deben presentarse mediante moléculas de HLA-A2 de clase I y mostrarse en la superficie de células tumorales que expresan estas proteínas endógenamente. Como fuente de LTC específicos para péptidos presentados mediante moléculas de HLA-A2 de clase I se usaron individuos respondedores HLA-A2 negativos, y este enfoque permitió la identificación de péptidos independientes de posible tolerancia de LTC autólogos presentados mediante HLA-A2.

50 Uno de los epítomos peptídicos divulgado en el documento WO00/26249 es RMFPNAPYL (que también se ha denominado pWT126), y anteriormente se ha descrito un LTC que puede: destruir dianas HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126, derivado de WT1 (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203); destruir células de leucemia recientes HLA-A2 positivas que expresan WT1 (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203); destruir células progenitoras de UFC de leucemia HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203; Bellantuono *et al* (2002) Blood 100, 3835-3837); destruir células madre de leucemia LTC-IC (del inglés *long term culture initiating cells*) HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2002) Blood 100, 3835-3837); destruir células iniciadoras de leucemia NOD/SCID HLA-A2
55 positivas (Gao *et al* (2003) Blood 75, 1429-1436); y no destruir células madre hematopoyéticas normales de injertos NOD/SCID HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2003) Transplantation 75, 1429-1436). Sin embargo, ninguna de estas publicaciones proporciona información molecular concerniente al RCT presente en el LTC, y la línea particular de LTC mencionada en las publicaciones no se ha puesto a disposición del público de ningún modo y por tanto la estructura del RCT se desconoce y el experto no podría obtenerla (ya que la línea de LTC no está disponible al público).
60

65 Los presentes inventores han clonado ahora un RCT que es específico para RMFPNAPYL, un péptido de WT1 que se presenta mediante moléculas HLA-A2 de clase I, y han mostrado que la introducción del RCT en células T CD4 positivas o CD8 positivas, confiere a las células T modificaciones genéticamente, la capacidad de eliminar células cancerosas que expresan WT1 endógenamente. Además, los inventores han definido la estructura molecular del RCT, han identificado las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por la siglas *Complementary*

Determining Regions), y describen como fabricar RCT recombinantes que se piensa que conservan la misma especificidad que la de molécula la parental.

5 Los RCT pueden introducirse de un modo útil en una célula T derivada de un paciente (preferentemente un paciente HLA-A2 positivo) que padece un tumor maligno (en el que las células tumorales del paciente expresan WT1), y la célula T modificada genéticamente se introduce en el paciente con el fin de combatir el tumor maligno. En particular, se propone extraer células T de pacientes con cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, otros cánceres sólidos o leucemia, transducirlas *in vitro* con un vector retroviral que contenga los genes del RCT, y reinfundir las células T transducidas en los pacientes. La credibilidad de este enfoque se confirma demostrando en los Ejemplos 10 que los genes del RCT específicos de WT-1 pueden transferirse a células T humanas, que los genes dan lugar a una expresión del RCT en la superficie de células T receptoras, que las células T receptoras pueden eliminar células T diana HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126 y células tumorales HLA-A2 positivas que expresan W1 endógenamente.

15 Se conoce bien la estructura general de los receptores de células T (RCT), su estructura de dominios y la organización de los genes que los codifican, véase, por ejemplo, el Capítulo 11 de *Immunology*, segunda edición (1994), de Janis Kubly, W H Freeman & Co, Nueva York, EE.UU., y García *et al* (1999) *Ann. Rev. Immunol.*, 17, 369-397. Una clase común de RCT naturales es la clase $\alpha\beta$ en la que los RCT están constituidos por una cadena alfa distinta y una cadena beta distinta que forman un heterodímero que está asociado con la membrana de las células T. 20 Cada cadena alfa y beta está constituida por regiones que, en orden desde el extremo N al extremo C, son una secuencia líder, una región variable, una región constante, una secuencia conectora, una región transmembrana y una región de cola citoplasmática (véase la Figura 14 para una representación gráfica de la estructura del RCT $\alpha\beta$). La región variable de la cadena alfa se denomina región $V\alpha$ y la región variable de la cadena beta se denomina región $V\beta$. De un modo similar, la región constante de la cadena alfa se denomina región $C\alpha$ y la región constante de la cadena beta se denomina región $C\beta$. La misión del RCT $\alpha\beta$ es reconocer y unirse a un péptido presentado en una molécula de HLA de una célula en el organismo. Hablando de manera general, el RCT no puede reconocer y unirse al péptido a menos que este se presente mediante una molécula de HLA particular, y el RCT no puede reconocer una molécula de HLA a menos que ésta presente el péptido específico. Las células T que alojan un RCT específico se dirigirán a células diana que estén presentando un péptido específico en una molécula de HLA particular en una célula (es decir, un complejo péptido-HLA), y este es el principio esencial de la inmunidad basada en células T. 30

El complejo péptido-HLA es reconocido por las regiones V combinadas de las cadenas alfa y beta del RCT. En particular, son las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las regiones V las que intervienen en el reconocimiento del complejo péptido-HLA. La región V de las cadenas alfa y beta del RCT natural están 35 constituidas por, en orden en dirección del extremo N-terminal al C-terminal, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3, representando FR (por las siglas *Framework Región*) la "región marco conservada" y CDR la "región determinante de la complementariedad". Las FR y CDR de las cadenas alfa y beta son distintas.

40 A partir de la secuencia de aminoácidos predicha de las cadenas alfa y beta del RCT clonado como se menciona anteriormente, los inventores han determinado las FR y CDR de las cadenas alfa y beta (véanse las Figuras 2 y 4). Conociendo las secuencias CDR, es posible producir RCT quiméricos en los cuales las CDR se injertan en regiones marco conservadas con las cuales las CDR no se asocian naturalmente, y también es posible producir moléculas de RCT monocatenario, y en ambos casos las moléculas conservan sustancialmente la misma afinidad de unión por el complejo péptido-HLA que la de la molécula parental, como se describe con más detalle más adelante. 45

Un primer aspecto de la invención proporciona una molécula de receptor de células T (RCT) que contiene una parte de cadena alfa y una parte de cadena beta, en la que la parte de cadena alfa contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

50 CDR1 α : SSYSPS;
CDR2 α : YTSAATL; y
CDR3 α : WSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADG-LT,

en la que la parte de cadena beta contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

55 CDR1 β : DFQATT;
CDR2 β : SNEGSKA; y
CDR3 β : SARDGGEG o RDGGEGSETQY, y

60 en la que en una o más de las CDR se reemplazan hasta tres restos de aminoácidos por otro resto de aminoácido, cuya molécula de RCT puede unirse a un complejo HLA-A2/RFMP-NAPYL.

Debería observarse que, en algunos sistemas de nomenclatura, la CDR3 de las cadenas β puede definirse por ser más larga que en el sistema de nomenclatura usado en la base de datos *Immunogenetics* (IMGT) que se describe a 65 continuación. También, en algunos sistemas de nomenclatura la CDR3 de las cadenas α puede definirse por ser más corta que en el sistema IMGT. De un modo similar, la parte constante puede o no incluir restos marco

conservados flanqueando la región CDR3 en los distintos sistemas de nomenclatura.

Por lo tanto, en una realización que usa el sistema IMGT la CDR3 α puede tener la secuencia de aminoácidos VVSPFSGGGADGLT y la parte constante incluye la secuencia de aminoácidos marco conservada FGKGTHLIQP (véase la Figura 5).

En otra realización, usando el sistema de nomenclatura de García (García *et al* (1999) Ann. Rev. Immunol., 17, 369-397, incorporado en el presente documento por referencia) la CDR3 α comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SPFSGGGADGLT, la región marco conservada inmediatamente en el C-terminal con respecto a esta tiene la secuencia de aminoácidos FGKGTHLIQP y la región constante comienza con la secuencia de aminoácidos YIQNP ... (Véase la Figura 5)

En una realización que usa el sistema de nomenclatura IMGT, la CDR3 β puede tener la secuencia de aminoácidos SARDGGEG y la región constante inmediatamente en el C-terminal con respecto a esta incluye la secuencia de aminoácidos marco conservados SETQY... (Figura 4).

En otra realización, usando el sistema de nomenclatura de García indicado anteriormente, la CDR3 β comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RDGGEGSETQY y la región marco conservada inmediatamente en el C-terminal con respecto a esta tiene la secuencia de aminoácidos FGPGTRLLVL y la región constante inmediatamente en el C-terminal comienza con la secuencia de aminoácidos EDLKN ... (Véase la Figura 6)

Se apreciará que el experto puede diseñar y sintetizar fácilmente los RCT de acuerdo con la invención usando cualquiera o alguno de los sistemas de nomenclatura siempre que la región marco conservada (es decir, la región no reemplazada por las CDR) sea compatible con las CDR de un modo que se conoce bien en la técnica.

A lo largo de la memoria descriptiva se usa el código convencional de aminoácidos de una letra de la IUPAC. Para evitar dudas, una referencia a una CDR "particular" o "determinada" significa cualquier CDR con la secuencia de aminoácidos determinada anteriormente o en la que se han reemplazado hasta tres aminoácidos por otro resto de aminoácido.

Por "molécula de RCT" se incluye cualquier molécula que contenga las CDR determinadas y que también contenga las FR situadas adecuadamente dentro de la molécula de modo que las CDR formen un sitio de reconocimiento (sitio de combinación) que pueda unirse al HLA-A2 que presenta el péptido RMFPNAPYL (es decir, un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL).

Particularmente se prefiere que las moléculas de RCT contengan las secuencias de aminoácidos de las CDR exactas tal como se proporciona anteriormente y en las Figuras 2 y 4 y en las Figuras 5 y 6. Cuando una variante de esta secuencia exacta está presente, esta varía preferentemente en uno o dos o tres (preferentemente uno o dos) aminoácidos en una o dos o tres o cuatro o cinco o las seis CDR. Normalmente, en estas variantes, los aminoácidos que se reemplazan son reemplazados por aminoácidos conservativos. Por aminoácidos conservativos se incluyen los grupos: G, A; S, A, T; F, Y, W; D, E; N, Q; y I, L, V.

A continuación se proporciona un método para preparar y seleccionar moléculas de RCT que tienen CDR que varían de las secuencias CDR exactas proporcionadas en las Figuras 2 y 4 y en las Figuras 5 y 6.

Las secuencias de aminoácidos, que incluyen las regiones V (y por lo tanto las FR), de numerosas cadenas alfa y cadenas beta del RCT se conocen bien en la técnica, algunas de las cuales se describen en la base de datos IMGT (Immunogenetics) <http://imgt.cines.fr>. Véase también Lefranc (2003) Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77. La base estructural del reconocimiento de las células T se revisa en García *et al* (1999) Ann. Rev. Immunol., 17, 369-397, y la información contenida en el mismo puede usarse para diseñar y sintetizar los RCT con CDR injertadas (y las CDR definidas basándose en esta nomenclatura tal como se indicó anteriormente). Preferentemente, las FR en las que se injertan las CDR particulares son FR de cadenas alfa o beta del RCT humano. Convenientemente, las CDR de la cadena alfa se injertan en las FR de la cadena alfa, y las CDR de la cadena beta se injertan en las FR de la cadena beta. Normalmente, las tres CDR en la cadena alfa y las tres CDR en la cadena beta reemplazan, en orden, las CDR en otras cadenas alfa y beta humanas, respectivamente. Véase Lefranc (2003) Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77.

Normalmente, las células T que expresan la molécula de RCT reconocen el péptido presentador de HLA-A2 RMFPNAPYL que tiene sustancialmente la misma avidéz que la molécula de RCT que consta de las cadenas alfa y beta como se describe en las Figuras 2 y 4. Esto puede medirse por transferencia mediada por retrovirus del RCT en células T seguido de experimentos de titulación peptídica con las células T transducidas con el RCT como se explica esquemáticamente, por ejemplo, en Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203.

La molécula de RTC contiene preferentemente una parte de cadena alfa que contiene, ordenada del extremo N al extremo C, FR1 α -CDR1 α -FR2 α -CDR2 α -FR3 α -CDR3 α , y una parte de cadena beta que contiene, ordenada del extremo N al extremo C, FR1 β -CDR1 β -FR2 β -CDR2 β -FR3 β -CDR3 β como se muestra en las Figuras 2 y 4, respectivamente y en las Figuras 5 y 6, respectivamente. Normalmente, la molécula de RCT contiene la región V

tanto de la cadena alfa como de la cadena beta de las cadenas polipeptídicas del RCT mostradas en las Figuras 2 y 4, y en las Figuras 5 y 6.

5 En una realización preferida, la parte de cadena alfa y la parte de cadena beta están presentes en distintas cadenas polipeptídicas. Normalmente, la molécula de RCT contiene una cadena alfa que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica mostrada en la Figura 2 (o Figura 5), y también contiene una cadena beta que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica mostrada en la Figura 4 (o Figura 6). Preferentemente, la molécula de RCT consta de una molécula que contiene la cadena alfa completa mostrada en la Figura 2 y la cadena beta completa mostrada en la Figura 4. Sin embargo, normalmente, la secuencia líder se escinde de la cadena alfa y
10 cadena beta madura.

15 En una realización adicional, la parte de cadena alfa y la parte de cadena beta de la molécula de RCT están presentes en la misma cadena polipeptídica. Las moléculas de RCT monocatenarias se describen en Chung *et al* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 91: 12654-12658, y los principios que se describen en el mismo pueden aplicarse fácilmente a la producción de moléculas de RCT monocatenarias que contienen las CDR especificadas. Normalmente, las moléculas de RCT monocatenarias contienen los dominios V α , V β y C β fusionados en la misma cadena polipeptídica, y normalmente en ese orden (del extremo N al extremo C). Para la expresión de un RCT monocatenario es útil proporcionar una construcción que codifique el dominio constante de la cadena alfa del RCT.

20 Una estrategia adicional se describe en Boulter *et al* (2003) Protein Eng. 16:707-711 donde se introduce un nuevo enlace disulfuro entre una treonina en la región constante de la cadena alfa y una serina en la región constante de la cadena beta (reemplazando estos restos por una cisteína). El enlace disulfuro en el péptido que conecta el RCT puede eliminarse o puede permanecer en su sitio.

25 Las moléculas de RCT bicatenarias de la invención (por ejemplo, las que contienen las cadenas alfa y beta cuya secuencia de aminoácidos se proporciona en las Figuras 2 y 4) o RCT quiméricas que contienen las CDR específicas, como se describe anteriormente, pueden usarse para crear LTC específicos de antígeno como se describe con más detalle a continuación (usando polinucleótidos que codifican las cadenas relevantes). De un modo similar, los RCT monocatenarios también pueden usarse para este fin, y tienen la ventaja de que no se emparejan
30 con RCT endógenos. Los RCT monocatenarios también pueden usarse como construcciones solubles de un modo similar a los anticuerpos. En este caso, las construcciones monocatenarias no contienen una región transmembrana (véase Chung *et al* anteriormente mencionados y Boulter *et al* anteriormente mencionados).

35 Un segundo aspecto de la invención proporciona un kit de partes que comprende un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en el primer aspecto de la invención y un polinucleótido que codifica la parte de cadena beta como se define en el primer aspecto de la invención. Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en el primer aspecto de la invención y un polinucleótido que codifica la parte de cadena beta como se define en el primer aspecto de la invención. Como se explica anteriormente, en una realización particularmente preferida de la invención, la parte
40 de cadena alfa y la parte de cadena beta están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas, y es conveniente (pero no obligatorio) que cada polipéptido se codifique por un polinucleótido distinto. Los polinucleótidos preferidos que codifican las cadenas alfa y beta se describen en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Como alternativa, los dos polipéptidos pueden codificarse en el mismo polinucleótido, en cuyo caso las dos regiones codificantes pueden estar unidas por una secuencia IRES (Sitio Interno de entrada al Ribosoma), y normalmente tendrían sus propios codones traducionales de inicio y terminación. Normalmente, dichas construcciones contienen dos promotores, uno para cada cadena de RCT. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en el primer aspecto de la invención, y la parte de cadena beta como se define en el primer aspecto de la invención.

50 Tal como se explica anteriormente, en una relación alternativa la parte de cadena alfa y la parte de cadena beta están presentes en el mismo polipéptido, en cuyo caso un solo polinucleótido puede codificar el polipéptido monocatenario.

55 En cualquier caso, el polinucleótido puede ser ADN o ARN, y puede contener o no intrones. Normalmente, el polinucleótido no contiene intrones dentro de la región que codifica el polipéptido de interés. Se apreciará que diferentes polinucleótidos pueden codificar el mismo polipéptido debido a la degeneración del código genético.

60 La invención también proporciona un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención. Dichos vectores de expresión, cuando están presentes en una célula hospedadora adecuada, permiten la expresión del polipéptido(o polipéptidos) de interés. Preferentemente, el vector de expresión es un vector de expresión que puede expresar un polipéptido en una célula de mamífero. Más preferentemente, el vector de expresión es uno que puede expresar un polipéptido en una célula T, tal como un LTC humano. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor que es activo en tipos celulares particulares, y que puede ser controlable (por ejemplo, inducible).

65 El vector es adecuadamente un vector retroviral que puede transfectarse en una célula hospedadora de mamífero tal

como una célula T humana. Normalmente, el vector es un vector lentiviral.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención o un vector de la invención. La célula hospedadora puede contener un polinucleótido o un vector que codifique solo la parte de cadena alfa o solo la parte de cadena beta. Sin embargo, si la célula hospedadora es para producir una molécula de RCT de la invención, esta contiene uno o más polinucleótidos o vectores que codifican tanto la parte de cadena alfa como la parte de cadena beta.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula tal como una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula de mamífero, y los métodos para introducir polinucleótidos en dichas células son muy conocidos en la técnica. Normalmente, se usan células bacterianas, tales como células de *Escherichia coli*, para la propagación y la manipulación general de los polinucleótidos y vectores de la invención. Otras células hospedadoras pueden usarse para expresar las moléculas de RCT de la invención y, en particular, la célula puede ser una célula de mamífero tal como una célula humana. Tal como se describe a continuación con respecto a los métodos terapéuticos que usan las moléculas de RCT de la invención, es particularmente deseable que la célula hospedadora sea una célula T tal como (y preferentemente) una célula T derivada de un paciente a tratar, normalmente un paciente con un tumor maligno que exprese WT1.

Normalmente, un vector retroviral (o, como es el caso pueden ser vectores) que codifique la molécula de RCT de la invención se usa basándose en su capacidad para infectar linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ humanos maduros y para intervenir en la expresión génica: el sistema Kat de vectores retrovirales es una posibilidad preferida (véase Finer *et al* (1994) Blood 83, 43). Para infectar los linfocitos T CD8⁺ purificados aislados de la sangre periférica de pacientes con tumores se usan retrovirus anfitriónicos de alta titulación siguiendo un protocolo publicado por Roberts *et al* (1994) Blood 84, 2878-2889, incorporado en el presente documento por referencia. Los anticuerpos anti-CD3 se usan para desencadenar la proliferación de células T, lo que facilita la integración retroviral y la expresión estable de RCT monocatenarios. Una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 puede ser más eficaz que los anticuerpos anti-CD3 solos. Otros sistemas adecuados para introducir genes en LTC se describen en Moritz *et al* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 4318-4322, incorporado en el presente documento por referencia. Eshhar *et al* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 720-724 y Hwu *et al* (1993) J. Exp. Med. 178, 361-366 también describen la transfección de LTC. El sistema Nuclofactor, disponible en el comercio, proporcionado por AMAXA, Alemania, puede usarse para transfectar células T. La transducción retroviral de células T CD8⁺ humanas se describe en Stanislawski (2001) Nat. Immunol. 2, 962.

En la técnica son muy conocidos los métodos de clonación y manipulación genética y se describen con detalle en manuales convencionales tales como Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) USA.

Los pacientes que padecen un tumor maligno que expresa WT-1 pueden tratarse mediante la introducción de la molécula de RCT de la invención en sus propias células T (o células T de un donante), seguido de la introducción de estas células modificadas genéticamente en el paciente. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una célula T, preferentemente una célula T derivada de un paciente, modificada para que exprese la molécula de RCT de la invención, en la fabricación de un medicamento para combatir un tumor maligno que expresa WT1 en el paciente, en el que el tumor maligno que expresa WT1 es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma o sarcoma.

Normalmente, (1) se obtienen células T del paciente, (2) un polinucleótido o polinucleótidos que codifican y pueden expresar la molécula de RCT de la invención se introducen en las células T *ex vivo* y (3) las células T modificadas genéticamente se introducen en el paciente. Particularmente se prefiere que las células T sean las células T del paciente (es decir, autólogas).

Particularmente se prefiere que el paciente sea HLA-A2 positivo.

En otras palabras, la especificidad de la célula T, preferentemente la célula T autóloga, se cambia por la introducción de la molécula de RCT de la invención.

Las células T (por ejemplo del paciente) se aíslan normalmente de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), y pueden ser células CD4⁺ y CD8⁺. Normalmente, las células se activan usando un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28) de modo que se vuelvan receptivas a la transfección, por ejemplo, con uno o más vectores retrovirales que codifican las moléculas RCT de la invención. El número de células aisladas, transfectadas y devueltas al paciente puede determinarlo el médico.

Las células pueden extraerse de un paciente después de una respuesta clínica, crioconservarse, transfectarse y reinfundirse si recae el mismo paciente.

Puede determinarse si un tumor maligno es uno que expresa o no WT1, por ejemplo, usando reacción en cadena de

polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o usando técnicas de tinción intracelular para la proteína WT1 (que pueden ser anticuerpos anti-WT1).

5 El paciente es preferentemente un paciente humano aunque pueden usarse animales en una situación de investigación. En particular se prefiere que el paciente sea HLA-A2 positivo. Puede determinarse si un paciente es o no HLA-A2 positivo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

10 Tal como se explica anteriormente, las moléculas de RCT, en las que una o más de las CDR difieren en secuencia de las secuencias CDR exactas proporcionadas en las Figuras 2 y 4, forman parte de la invención. Preferentemente, dichas moléculas de RCT pueden reconocer el complejo HLA-A2/RMFPNAPYL más eficazmente que una molécula de RCT con las secuencias CDR exactas. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para seleccionar una molécula de RCT con unión mejorada a un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL que comprende:

15 (a) proporcionar una molécula de RCT que contiene una parte de cadena alfa y una parte de cadena beta, en la que la parte de cadena alfa contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDR1 α : SSYSPS;
CDR2 α : Y TSAATL; y
CDR3 α : WSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT,

20 en la que la parte de cadena beta contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDR1 β : DFQATT;
CDR2 β : SNEGSKA; y
CDR3 β : SARDGGEG o RDGGEGSETQY, y

25 en la que al menos un resto de aminoácido en una o más de las CDR, como las proporcionadas, se reemplaza por otro resto de aminoácido;

30 (b) determinar si la molécula de RCT se une a un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL con mayor afinidad que una molécula de RCT sin el aminoácido (o aminoácidos) de reemplazo; y

(c) seleccionar una molécula que se una con mayor afinidad.

35 Preferentemente, la CDR3 β tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.

40 Las moléculas de RCT con las CDR alteradas pueden fabricarse fácilmente mediante métodos de modificación genética de proteínas. Por ejemplo, puede fabricarse una biblioteca de presentación de RCT en la que las regiones CDR de cadena alfa y/o cadena beta se mutagenizan y las moléculas de RCT se presentan usando transducción retroviral en la superficie de un linfoma de células T (véase Kessels *et al* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 14578-14583), o en la superficie de una levadura o un bacteriófago. Un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL puede usarse para seleccionar células o bacteriófagos que se unen al complejo con alta afinidad en virtud de la molécula de RCT que presentan. Las moléculas de RCT que tienen una mayor afinidad de unión (K_D más baja) que una molécula de RCT con las secuencias CDR exactas se seleccionan para estudios adicionales.

45 La invención se describirá ahora con más detalle por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la cadena alfa del RCT específico de pWT126 (V α -1.5).

50 La figura 2 muestra la secuencia proteica de la cadena alfa del RCT específico de pWT126 (V α -1.5). Se marca la posición de las CDR, de las FR y de la región constante. La secuencia líder se muestra en negrita.

La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la cadena beta del RCT específico de pWT126 (V β -2.1).

55 La figura 4 muestra la secuencia proteica de la cadena beta del RCT específico de pWT126 (V β -2.1). Se marca la posición de las CDR, de las FR y de la región constante.

60 La figura 5 muestra la misma secuencia proteica que la de la Figura 2 pero se indica que la posición de inicio de la región constante está en un sitio diferente. La secuencia de la CDR en esta figura, que comienza después de C, se basa en la nomenclatura IMGT (basada en la secuencia primaria). La nomenclatura de García se basa en la estructura y no incluye VV después de la C (es decir, comienza en SPF...): V α 8.2 significa segmento génico variable alfa 8.2 y J45 significa segmento génico de unión 45.

65 La figura 6 muestra la misma secuencia proteica que la de la Figura 4 excepto que se indica que la CDR3 β es más larga y se indica que la posición de inicio de la región constante está en un sitio diferente. La secuencia

CDR de esta figura, que comienza después de C, se basa en la nomenclatura IMGT (basada en la secuencia primaria). La nomenclatura de García se basa en la estructura y no incluye SA después de la C (es decir, comienza en RDGG...): J2.5 se refiere al segmento génico de unión 2.5.

5 La Figura 7 es un diagrama que muestra vectores retrovirales que contienen genes del RCT. Las cadenas alfa y beta del RCT se insertaron en el vector retroviral pMP71 (Engels *et al* (2003) *Human Gene Ther.* **14**, 1155-1168) para la transferencia génica en células T humanas. RTL es una repetición terminal larga. ERP es un elemento regulador post-transcripcional.

10 La Figura 8 es un diagrama que muestra la transferencia génica del RCT retroviral en células T humanas. Los linfocitos de sangre periférica se activaron con anticuerpos anti-CD3, IL-2 e IL-7, seguido, 3 días después de transducción con vectores retrovirales que codifican el RCT específico de WT1. La expresión del RCT se controló el día 6 usando anticuerpos específicos para el RCT-V-beta 2.1 (presente en el RCT transfectado). Las células T transducidas con simulación muestran el porcentaje de las células T humanas no manipuladas que expresan V-beta 2.1. Después de la transducción, las células T CD8 tanto positivas como negativas (es decir, CD4 positivas) tienen un porcentaje aumentado de células V-beta 2.1. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de V-beta 2.1 se muestran en las figuras 3 y 4.

20 La Figura 9 muestra que la estimulación repetida de células transducidas con el RCT (como se muestra en la Fig.8) con células T2 que presentan el péptido pWT126 conduce a una expansión de células T CD8 positivas que expresan V beta 2.1.

La Figura 10 muestra que las células T transducidas con el RCT (como se muestra en las Fig. 8 y 9) se tiñen con tetrámeros HLA-A2/pWT126.

25 La Figura 11 muestra que las células T transducidas con el RCT (como se muestra en las Fig. 8 y 9) eliminan las células T2 HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no las células T2 recubiertas con el péptido control pWT235 de unión a A2. Las células T también eliminan las células BV173 de leucemia, HLA-A2 positivas que expresan WT1 endógenamente.

30 La Figura 12 muestra que las células T CD8 positivas transducidas con el RCT eliminan células T2 HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no células T2 recubiertas con el péptido control pWT235 de unión a A2. Las células T CD8 positivas también eliminan células BV173 de leucemia, HLA-A2 positivas que expresan WT1 endógenamente.

35 La Figura 13 muestra que un pequeño porcentaje de células T CD4 positivas transducidas con el RCT se tiñen con tetrámeros HLA-A2/pWT126.

40 La Figura 14 muestra que las células T CD4 positivas transducidas con el RCT purificadas eliminan células T2 HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no células T2 recubiertas con el péptido control pWT235 de unión a A2. Las células T CD4 positivas también eliminan células BV173 de leucemia, HLA-A2 positivas que expresan WT1 endógenamente.

45 La Figura 15 muestra que las células T CD8 positivas transducidas con el RCT purificadas producen IFN- γ después de estimulación con células T2 HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no con células T2 recubiertas con el péptido control pWT235 de unión a A2. También, las células T CD8 positivas producen IFN- γ después de estimulación con células BV173 de leucemia, HLA-A2 positivas que expresan WT1 endógenamente.

50 La Figura 16 es un diagrama esquemático que muestra la estructura general de las moléculas de RCT $\alpha\beta$. Los números de aminoácidos mencionados no corresponden necesariamente a los de las Figuras 2 y 4.

Anexo de Nos de SEC ID

- 55 1. RMFPNAPYL
 2. SSYSPS
 3. YTSAATL
 4. VVSPFSGGGADGLT
 5. SPFSGGGADGLT
 60 6. DFQATT
 7. SNEGSKA
 8. SARDGGEG
 9. RDGGEGSETQY
 10. FGKGTLLIQP
 65 11. YIQNP
 12. SETQY

13. FGGPTRLVL
 14. EDLKN
 15. Secuencia de nucleótidos de la Figura 1
 16. Secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (y de la Figura 5)
 5 17. Secuencia de nucleótidos de la Figura 3
 18. Secuencia de aminoácidos de la Figura 4 (y de la Figura 6)

Ejemplo 1: Receptor de células T (RCT) funcionalmente activo específico para el péptido derivado de WT-1 pWT126 (RMFPNAPYL)

10 Se ha clonado un receptor de células T (RCT) que es específico para un péptido (pWT126; RMFPNAPYL) del antígeno tumoral de Wilms 1 (WT1) presentado mediante moléculas HLA-A2 de clase I. El factor de transcripción WT1 se expresa en diversos tumores malignos humanos, incluyendo leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y otros. Los LTC, a partir de los cuales se clonó el RCT, muestran actividad de
 15 eliminación contra células cancerosas humanas que expresan WT1, pero no contra células humanas normales que expresan niveles fisiológicos de WT1.

El objetivo terapéutico es proporcionar al paciente células T con esta actividad de eliminación fuerte y específica por
 20 transferencia de los genes que codifican el RCT. Para esto, los genes del RCT se insertaron en vectores retrovirales y se demostró que las células T humanas transducidas génicamente mostraban actividad de eliminación contra líneas celulares humanas de leucemia y cáncer que expresan WT1. El perfil de especificidad de esta línea de LTC se ha descrito en varios artículos de investigación y puede resumirse como: (1) eliminan dianas HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126 derivado de WT1 (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203); (2) eliminan células de leucemia recientes HLA-A2 positivas que expresan WT1 (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203); (3) eliminan células
 25 progenitoras de UFC de leucemia HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2000) Blood 95, 2198-2203; Bellantuono *et al* (2002) Blood 100, 3835-3837); (4) eliminan células madre LTC-IC de leucemia HLA-A2 positivas (Bellantuono *et al* (2002) Blood 100, 3835-3837). (5) eliminan células iniciadoras de leucemia NOD/SCID HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2003) Transplantation 75, 1429-1436); y (6) no eliminan células madre hematopoyéticas de injertos NOD/SCID normales HLA-A2 positivas (Gao *et al* (2003) Transplantation 75, 1429-1436). Se ha mostrado ahora que las células T
 30 humanas transducidas con el RCT específico de WT1 presentan especificidad similar a la de la línea de LTC a partir de la cual se clonó el RCT.

Los datos descritos con detalle en las leyendas de las Figuras 1 a 15 indican que la transferencia génica del RCT en
 35 células T humanas es factible y que esto conduce a la expresión en superficie de las cadenas del RCT introducidas. Las células T receptoras muestran actividad de eliminación contra dianas HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pWT126. Las células T transducidas con el RCT también eliminan células tumorales humanas que expresan WT1 endógenamente. Además, las células T transducidas producen IFN-g de un modo específico de péptido restringido al HLA-A2. Finalmente, el RCT transferido puede funcionar en células T auxiliares CD4 positivas. Estas células T CD4 positivas muestran actividad de eliminación específica de antígeno, restringida al HLA-A2 y
 40 producción de citocinas específica de antígeno (no mostrada). Esto indica que la transferencia génica del RCT puede usarse para conferir una función efectora específica de antígeno restringida al HLA de clase I a células T humanas tanto CD8 positivas como CD4 positivas.

Ejemplo 2: Selección y tratamiento de un paciente

45 Se extraen células monocíticas de sangre periférica (CMSP) de un paciente HLA-A2 positivo que tiene un tumor maligno que expresa WT1. Las CMSP se activan con anticuerpos anti-CD3/CD28 añadidos al cultivo o en esferas durante 3 días y después se transducen con partículas retrovirales que codifican el RCT como se describe en el Ejemplo 1. El día 5 se puede demostrar que las células T CD4 y CD8 transducidas expresan el RCT introducido. El
 50 día 6 se puede demostrar la actividad específica de antígeno de las células T transducidas. El día 6 las células T transducidas se reinfunden en el paciente.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de receptor de células T (RCT) que contiene una parte de cadena alfa y una parte de cadena beta, en la que la parte de cadena alfa contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
- 5 CDR1 α : SSYSPS;
 CDR2 α : Y TSAATL; y
 CDR3 α : WSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT,
- 10 en la que la parte de cadena beta contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
- CDR1 β : DFQATT;
 CDR2 β : SNEGSKA; y
 CDR3 β : SARDGGEG o RDGGEGSETQY, y
- 15 en la que en una o más de las CDR se reemplazan hasta tres restos de aminoácidos con otro resto de aminoácido, cuya molécula de RCT puede unirse a un complejo HLA-A2/RFMPNAPYL.
2. Una molécula de RCT de acuerdo con la Reivindicación 1 en la que la CDR3 α tiene la secuencia de aminoácidos
- 20 WSPFSGGGADGLT.
3. Una molécula de RCT de acuerdo con la Reivindicación 1 en la que la CDR3 α tiene la secuencia de aminoácidos SPFSGGGADGLT.
- 25 4. Una molécula de RCT de acuerdo con la Reivindicación 1 en la que la CDR3 β tiene la secuencia de aminoácidos SARDGGEG.
5. Una molécula de RCT de acuerdo con la Reivindicación 1 en la que la CDR3 β tiene la secuencia de aminoácidos RDGGEGSETQY.
- 30 6. Una molécula de RCT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la parte de cadena alfa y la parte de cadena beta están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas.
7. Una molécula de RCT de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 en la que la parte de cadena
- 35 alfa y la parte de cadena beta están presentes en la misma cadena polipeptídica.
8. Una molécula de RCT de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7 en la que las CDR se injertan en una región marco conservada humana.
- 40 9. Una molécula de RCT de acuerdo con la Reivindicación 8 en la que la parte de cadena alfa tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2.
10. Una molécula de RCT de acuerdo con las Reivindicaciones 8 o 9 en la que la parte de cadena beta tiene la
- 45 secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 4.
11. Una molécula de RCT de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10 que es soluble.
12. Un kit de partes que comprende un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en la
- 50 Reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica la parte de cadena beta como se define en la Reivindicación 1.
13. Una composición que comprende un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en la
- Reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica la parte de cadena beta como se define en la Reivindicación 1.
14. Un polinucleótido que codifica la molécula de RCT monocatenaria como se define en la Reivindicación 7, o que
- 55 codifica la parte de cadena alfa como se define en la Reivindicación 1 y la parte de cadena beta como se define en la Reivindicación 1.
15. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 14 o que comprende
- 60 un polinucleótido que codifica la parte de cadena alfa como se define en la Reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica la parte de cadena beta como se define en la Reivindicación 1.
16. Un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 15 que es un vector retroviral.
17. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 14 o un vector de
- 65 expresión de acuerdo con las Reivindicaciones 15 o 16.

18. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de acuerdo con las Reivindicaciones 15 o 16.
19. Una célula hospedadora de acuerdo con las Reivindicaciones 17 o 18 que es una célula T.
- 5 20. Una célula hospedadora de acuerdo con la Reivindicación 19 que es una célula T derivada de un paciente.
21. Una célula T, preferentemente una célula T derivada de un paciente, modificada para expresar la molécula de RCT de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, para su uso para combatir un tumor maligno de expresa WT1 en el paciente, en donde el tumor maligno que expresa WT1 es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma o sarcoma.
- 10
22. La célula T de acuerdo con la Reivindicación 21, para su uso de acuerdo con la Reivindicación 21, en donde un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 14 o un vector de expresión de acuerdo con las Reivindicaciones 15 o 16 se ha introducido en la célula T, preferentemente una célula T derivada del paciente, de tal manera que la célula T expresa la molécula de RCT codificada.
- 15
23. La célula T de acuerdo con la reivindicación 22, para su uso de acuerdo con la Reivindicación 22, en donde se ha introducido un vector de expresión en la célula T.
- 20 24. Un método de selección de una molécula de RCT con unión mejorada a un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL que comprende:
- (a) proporcionar una molécula de RCT que contiene una parte de cadena alfa y una parte de cadena beta, en la que la parte de cadena alfa contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
- 25 CDR1 α : SSYSPS;
CDR2 α : Y TSAATL; y
CDR3 α : WSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT,
- 30 en la que la parte de cadena beta contiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
- CDR1 β : DFQATT;
CDR2 β : SNEGSKA; y
CDR3 β : SARDGGEG o RDGGEGSETQY,
- 35 y
- en donde en una o más de las CDR como las proporcionadas al menos un resto de aminoácido se reemplaza con otro resto de aminoácido;
- (b) determinar si la molécula de RCT se une a un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL con mayor afinidad que una molécula de RCT sin el aminoácido(o aminoácidos) de reemplazo; y
- 40 (c) seleccionar una molécula que se une con mayor afinidad.
25. Un método de acuerdo con la Reivindicación 24 en el que las CDR3 son como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 5.
- 45

Figura 1:

Secuencia codificante de V α -1.5 (V α -8.2) del RCT humano

ATGCTCCTGC TGCTCGTCCC AGTGCTCGAG GTGATTTTTA CTCTGGGAGG
 AACCAGAGCC CAGTCGGTGA CCCAGCTTGA CAGCCACGTC TCTGTCTCTG
 AAGGAACCCC GGTGCTGCTG AGGTGCAACT ACTCATCTTC TTATTCACCA
 TCTCTTTCT GGTATGTGCA ACACCCCAAC AAAGGACTCC AGCTTCTCCT
 GAAGTACACA TCAGCGGCCA CCCTGGTTAA AGGCATCAAC GGTTTTGAGG
 CTGAATTTAA GAAGAGTGAA ACCTCCTTCC ACCTGACGAA ACCCTCAGCC
 CATATGAGCG ACGCGGCTGA GTACTTCTGT GTTGTGAGTC CTTTTTCAGG
 AGGAGGTGCT GACGGACTCA CCTTTGGCAA AGGGACTCAT CTAATCATCC
 AGCCCTATAT CCAGAACCCT GACCCTGCCG TGTACCAGCT GAGAGACTCT
 AAATCCAGTG ACAAGTCTGT CTGCCATTTC ACCGATTTTG ATTCTCAAAC
 AAATGTGTCA CAAAGTAAGG ATTCTGATGT GTATATCACA GACAAAACCTG
 TGCTAGACAT GAGGTCTATG GACTTCAAGA GCAACAGTGC TGTGGCCTGG
 AGCAACAAAT CTGACTTTGC ATGTGCAAAC GCCTTCAACA ACAGCATTAT
 TCCAGAAGAC ACCTTCTTCC CCAGCCCCAGA AAGTTCCTGT GATGTCAAGC
 TGGTCGAGAA AAGCTTTGAA ACAGATACGA ACCTAAACTT TCAAAAACCTG
 TCAGTGATTG GGTCCGGAAT CCTCCTCCTG AAAGTGGCCG GGTTTAATCT
 GCTCATGACG CTGCGGCTGT GGTCACGCTG A

Figura 2

Secuencia proteica de $V\alpha$ -1.5 ($V\alpha$ -8.2) del RCT humano

MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLD^{FR1}SHVSVSEGT
 PVL^{CDR1}LLRCNYSS^{FR2}YSPSLFWYVQH^{FR3}PNKGLQLLLKYI
^{CDR2}SAAATLVKGINGFEEFKKSETSFHLTKPSAHMSDA
^{CDR3}AEYFCVVSPFSGGGADGLT
 constante
 FGK^{CDR3}GTH LIIQPYIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF
 TDFDSQTNVS QSKDSDVYIT DKTVLDMRSM
 DFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPED
 TFFPSESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL^{CDR3}SVIGFRIL
 LLKVAGFNLLMT LRLWSS

Figura 3:

Secuencia codificante de $V\beta$ -2.1 ($V\beta$ -20.1) del RCT humano

ATGCTGCTGC TTCTGCTGCT TCTGGGGCCA GGCTCCGGGC TTGGTGCTGT
 CGTCTCTCAA CATCCGAGCT GGGTTATCTG TAAGAGTGGA ACCTCTGTGA
 AGATCGAGTG CCGTTCCTG GACTTTCAGG CCACAACAT GTTTTGGTAT
 CGTCAGTTCC CGAAACAGAG TCTCATGCTG ATGGCAACTT CCAATGAGGG
 CTCCAAGGCC ACATACGAGC AAGGCGTCGA GAAGGACAAG TTTCTCATCA
 ACCATGCAAG CCTGACCTTG TCCACTCTGA CAGTGACCAG TGCCCCATCCT
 GAAGACAGCA GCTTCTACAT CTGCAGTGCT AGAGATGGGG GGGAGGGTTC
 GGAGACCCAG TACTTCGGGC CAGGCACGCG GCTCCTGGTG CTCGAGGACC
 TGAAAACGT GTTCCACCC GAGTTCGCTG TGTTTGAGCC ATCAGAAGCA
 GAGATCTCCC ACACCCAAA GGCCACACTG GTGTGCCCTGG CCACAGGCTT
 CTACCCCGAC CACGTGGAGC TGAGCTGGTG GGTGAATGGG AAGGAGGTGC
 ACAGTGGGT CAGCACAGAC CCGCAGCCCC TCAAGGAGCA GCCCGCCCTC
 AATGACTCCA GATACTGCCT GAGCAGCCGC CTGAGGGTCT CGGCCACCTT
 CTGGCAGAAC CCCCGCAACC ACTTCCGCTG TCAAGTCCAG TTCTACGGGC
 TCTCGGAGAA TGACGAGTGG ACCCAGGATA GGGCCAAACC TGTCACCCAG
 ATCGTCAGCG CCGAGGCCCTG GGGTAGAGCA GACTGTGGCT TCACCTCCGA
 GTCCTACCAG CAAGGGGTCC TGCTGCCAC CATCCTCTAT GAGATCTTGC
 TAGGGAAGGC CACCTTGTAT GCCGTGCTGG TCAGTGCCCT CGTGCTGATG
 GCCATGGTCA AGAGAAAGGA TTCCAGAGGC TAG

Figura 4

Secuencia proteica de V β -2.1 (V β -20.1) del RCT humano

MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECR FR1
 CDR1 FR2 CDR2
SLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQ
 FR3
GVEKDKFLINHASLTLTLTVTSAHPEDSSFYICSARD
 CDR3
GGEG
 constante
 SETQYFGPGTRLLVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ
 KATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQPL
 KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY
 GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ
 QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDS
 RG

Figura 5

Secuencia proteica de $V\alpha$ -1.5 ($V\alpha$ -8.2) del RCT humano

MLLLLVPVLEVI^{FR1}FTLGGTRAQSVTQLD^{FR1}SHVSVSEGT
 PVL^{CDR1}RCNYS^{FR2}SS^{FR2}YSP^{FR2}SLFWYVQH^{FR2}PNKGLQL^{FR2}LLKYI
^{CDR2}SAATLVK^{FR3}GIN^{FR3}GFEAE^{FR3}FKK^{FR3}SET^{FR3}SFHLTKPSAHMSDA
Va8.2 CDR3 J45
AEYFCVVSPE^{CDR3}SGGADGLTFGKG^{CDR3}TH LIIQP
 constante
 YIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVS
 QSKSDVYIT DKTVLDMRSM
 DFKSNSAVAWSNKSDFA^{CDR3}CAN AFNNSIIPED
 TFFPSPESSCDV^{CDR3}KL VEKSFETD^{CDR3}TNLFQ^{CDR3}NLSVIGFRIL
 LLKVAGFNLLMT LRLWSS

Figura 6

Secuencia proteica de V β -2.1 (V β -20.1) del RCT humano

MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSWVICKSGT**SVKIECR** FR1
CDR1 FR2 CDR2
SLDFQATTFWYRQFPKQSLMLMATSN**EGSKATYEQ**
FR3
GVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC**SARD**
 CDR3 J2.5
GGEGSETQYFGPGTRLLVL
 Constante 2
 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
 VELSWWVNGKEVHSGVSTDPPQLKEQPALNDSRYCLSS
 RLRVSATFWQNPРНHRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP
 VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK
 ATLYAVLVSALVLMAMVKKR**KDSRG**

Figura 7

Construcciones retrovirales del RCT

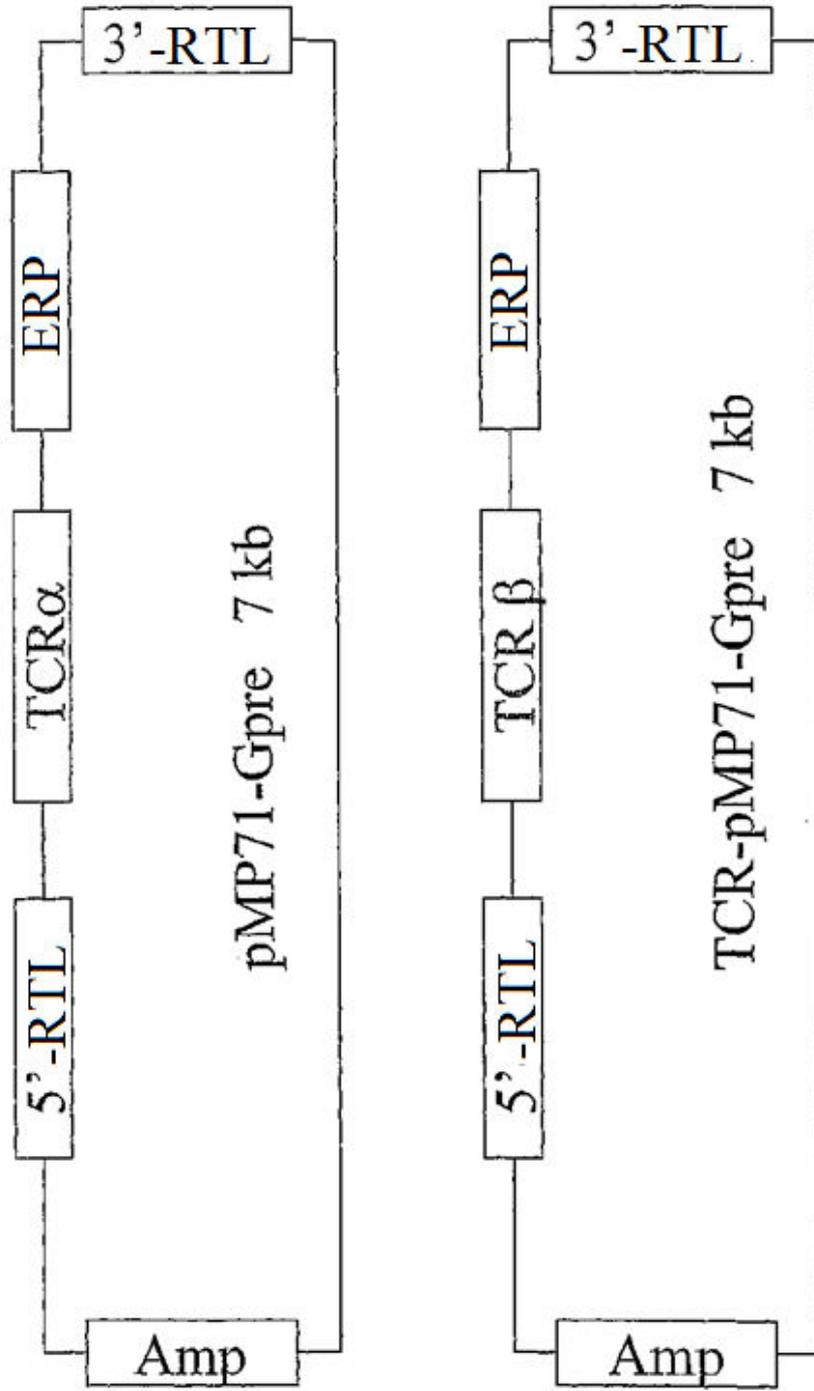


Figura 8

**Expresión del RCT en CMSP
humanas después de la transducción**

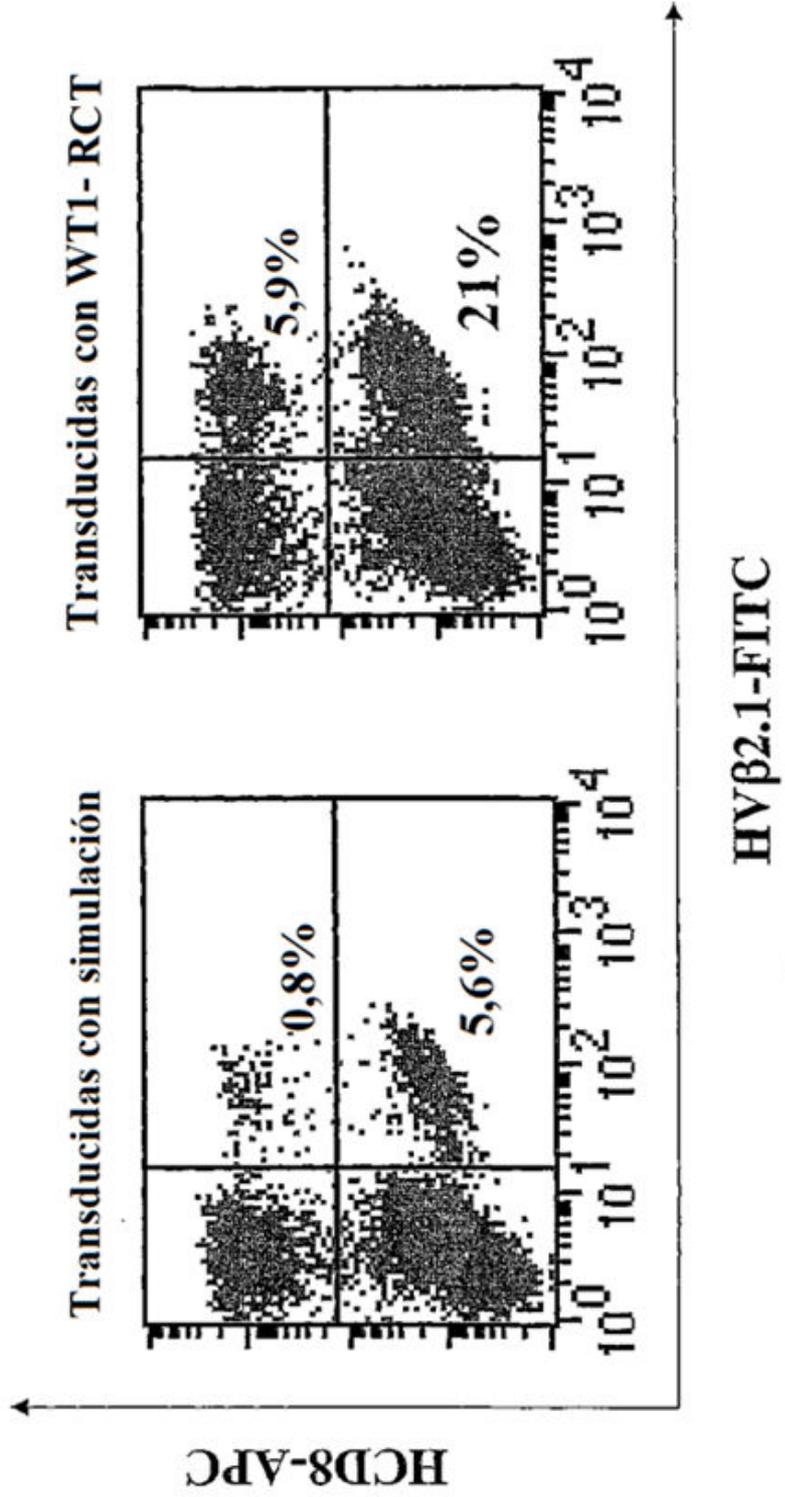


Figura 9

Aumento de las células T CD8+ ν B2.1+ después de la estimulación con antígenos

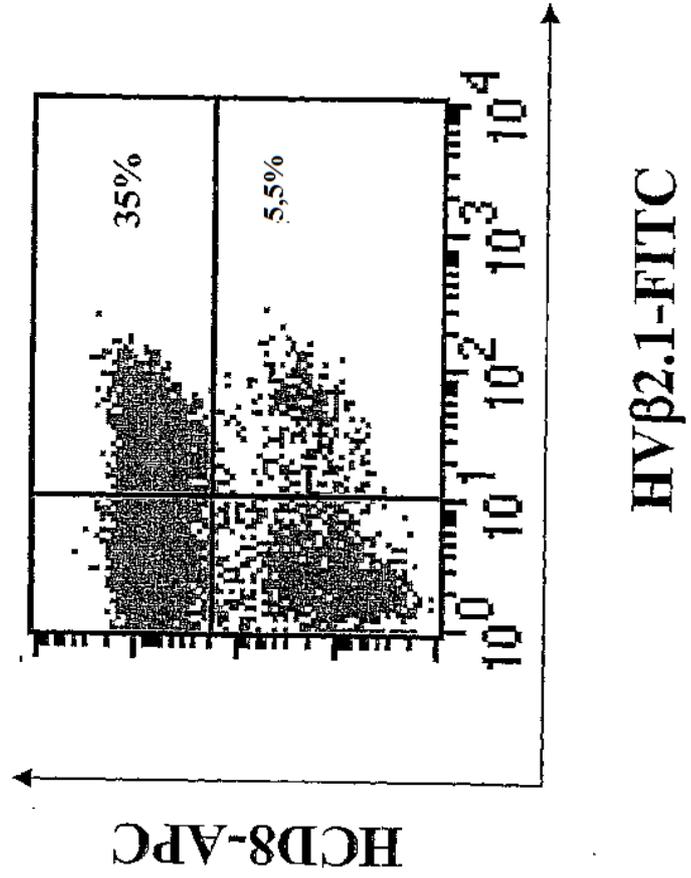


Figura 10

RCT específico para las CMSP de pWT126 transducidas

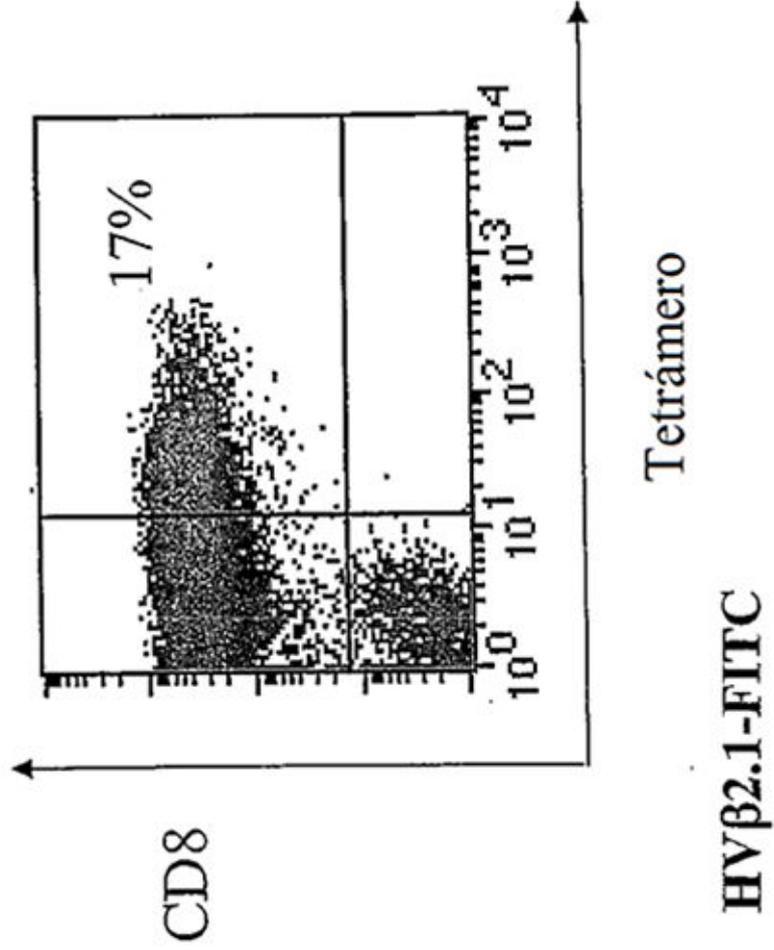


Figura 11

La mayoría de las células T transducidas con el RCT muestran actividad de eliminación específica de pWT126.

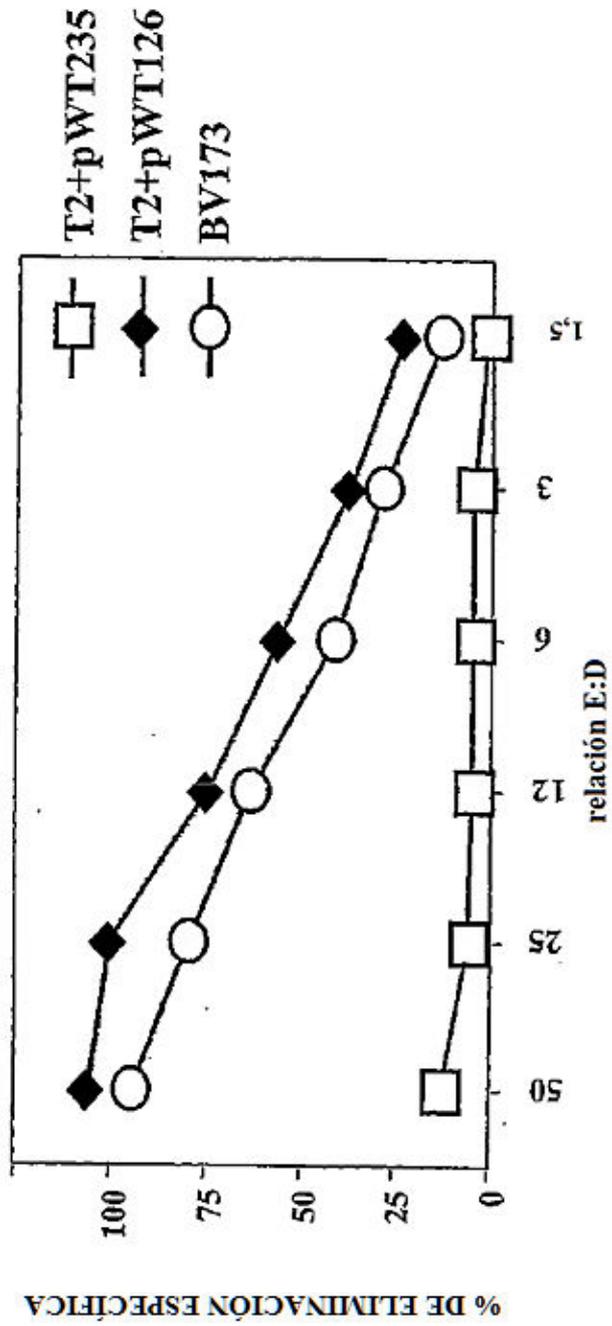


Figura 12

Las células T CD8+ transducidas con el RCT muestran actividad de eliminación específica de pWT126.

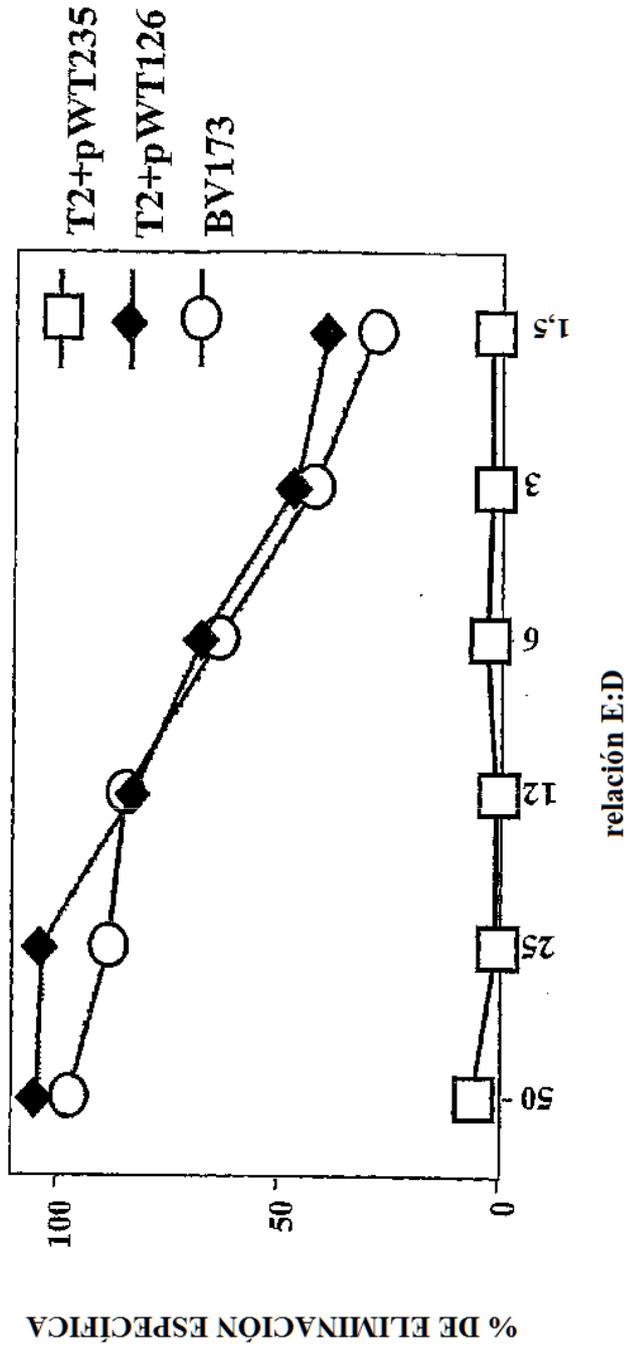


Figura 13

RCT específico para las CMSP CD4 transducidas con pWT126 clasificadas

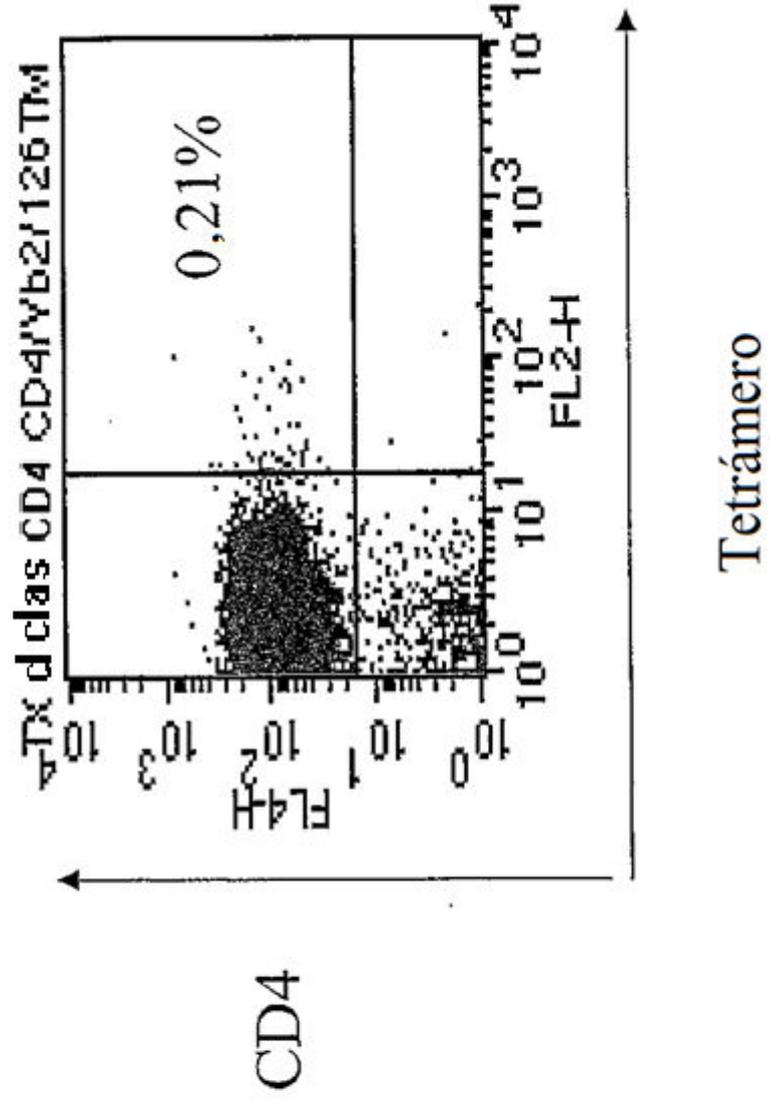


Figura 1.4

Las células T CD4+ transducidas con el RCT muestran actividad de eliminación específica de pWT126.

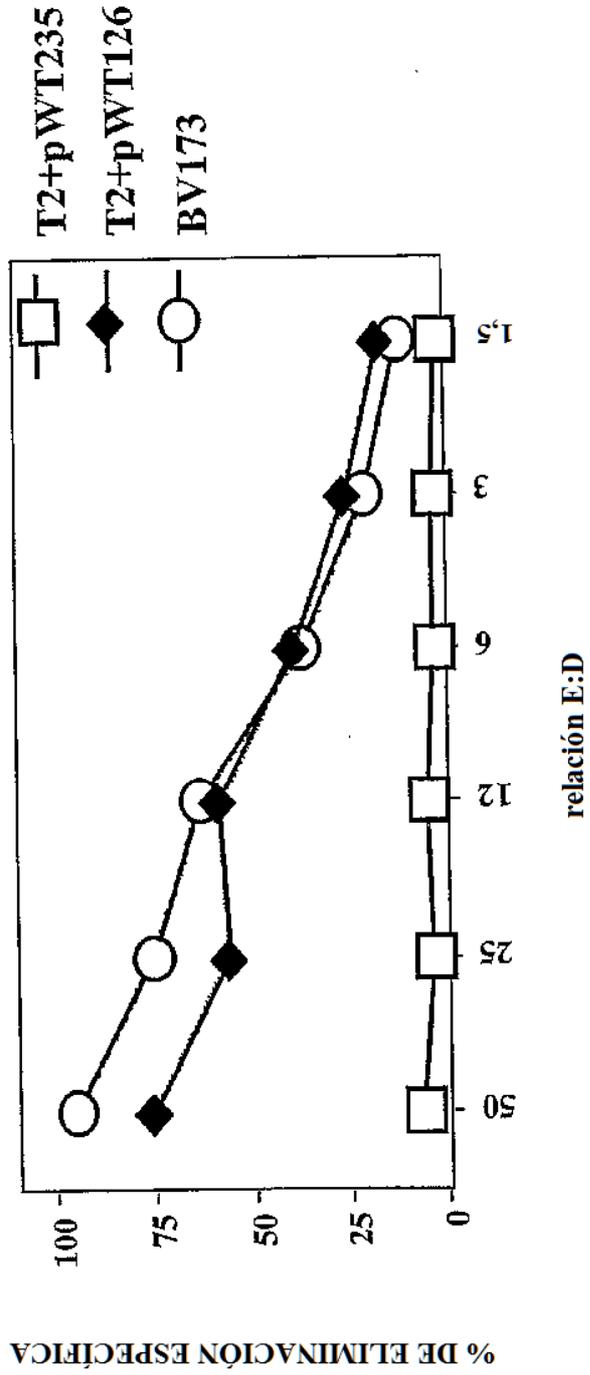
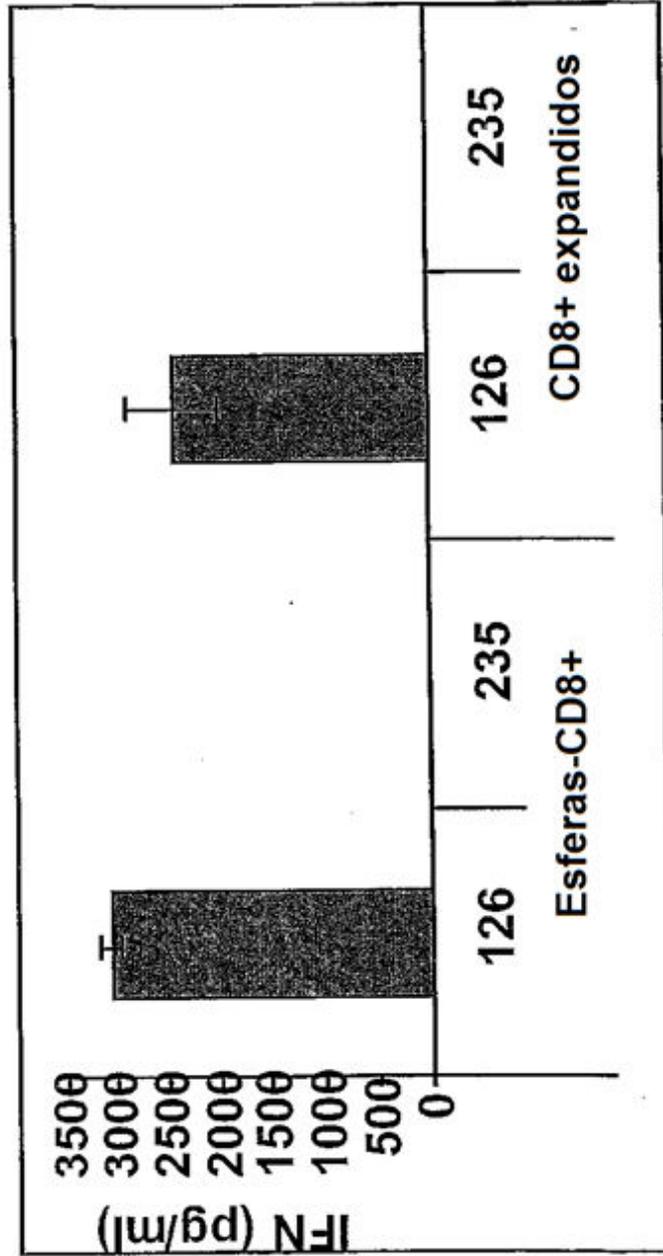


Figura 15
Las células T CD8+ transducidas con el RCT muestran producción de IFN- γ específica de pWT126.



Después de 20 h de incubación

Figura 16

