

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 010**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2006 E 10008612 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2275441**

54 Título: **Receptores de linfocitos T con alta afinidad por el VIH**

30 Prioridad:

01.04.2005 GB 0506760

10.08.2005 GB 0516487

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

31.01.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LTD. (50.0%)
101 Park Drive, Milton Park
Abingdon OX14 4RY, Oxfordshire, GB y
ADAPT IMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAKOBSEN, BENT KARSTEN;
MOLLOY, PETER EAMON;
LI, YI y
DUNN, STEVEN MARK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 599 010 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T con alta afinidad por el VIH

5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (TCR) que tienen la propiedad de unirse a SLYNTVATL-HLA-A*0201 derivado del polipéptido Gag del VIH. Los TCR comprenden al menos un dominio variable de la cadena α del TCR y/o al menos un dominio variable de la cadena β del TCR y tienen una K_D para dicho complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 de menos de o igual a $1 \mu\text{M}$ y/o tiene una constante de disociación (k_{off}) para el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ o más lenta.

10

Antecedentes de la invención

15 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El virus es un retrovirus con envuelta que pertenece al grupo de los lentivirus. El péptido SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16) se deriva del producto del gen g17 del gen Gag, uno de los nueve genes que componen el virus de la inmunodeficiencia 1 (VIH-1) El péptido se carga en el HLA-A*0201 y es presentado en la superficie de las células infectadas por el VIH. Por lo tanto, el complejo SLYNTVATL-HLA-A2*0201 proporciona un marcador del VIH que puede dirigirse al TCR, por ejemplo, para el propósito de la administración de agentes citotóxicos o inmunoestimuladores de las células infectadas. Sin embargo, para este fin, sería deseable que el TCR tuviese una

20 alta afinidad y/o una constante de disociación lenta para el complejo péptido-HLA.

20

Anikeeva et al. (Journal of Immunological methods 277 (2003) 75-86) describe un receptor de linfocitos T soluble derivado de un clon de linfocitos D3 citotóxicos CD8^+ humanos que reconoce el péptido Gag del VIH inmunodominante SLYNTVATL (SL9) en asociación con la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad de

25 clase 1 HLA-A2.

25

Breve descripción de la invención

30 La invención proporciona en un primer aspecto un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende la región variable de la cadena alfa del TCR de la Fig 1a y la región variable de la cadena beta del TCR de la Fig 1b.

30

El TCR del primer aspecto puede comprender la cadena alfa de la Fig 3a y la cadena beta de la Fig 3b.

35 El TCR del primer aspecto puede comprender la cadena alfa de la Fig 5a y la cadena beta de la Fig 5b.

35

El TCR del primer aspecto puede carecer de las regiones transmembrana y citoplasmática.

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una célula que alberga un vector de expresión de TCR que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa del TCR de la Fig 16a y la cadena beta de TCR de la Fig 16b.

40

45 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un linfocito T que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

50 La invención proporciona en un primer aspecto; un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende la región variable de la cadena alfa del TCR de SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena beta del TCR de SEQ ID NO: 2. El TCR del primer aspecto puede comprender la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 y la cadena beta de SEQ ID NO: 6 o puede comprender la cadena alfa de SEQ ID NO: 9 y la cadena beta de SEQ ID NO: 10. El TCR del primer aspecto puede carecer de las regiones transmembrana y citoplasmática.

50

55 La presentación en fagos proporciona un medio por medio del cual se pueden generar bibliotecas de variantes de TCR. Los métodos adecuados para la presentación de fagos y la posterior selección de bibliotecas de variantes de TCR que contienen cada uno un enlace disulfuro entre cadenas no nativo se detallan en (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) y en el documento WO 2004/04404.

55

60 Los TCR nativos existen en formas heterodiméricas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Sin embargo, se ha demostrado previamente que los TCR recombinantes que consisten en una sola cadena α del TCR o una sola cadena β del TCR unen moléculas de péptido-MHC.

60

En una realización, el TCR de la invención comprende tanto un dominio variable de la cadena α como de la dominio variable de la cadena β del TCR.

65 A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos del TCR de la presente memoria se proporcionan generalmente incluyendo un residuo de metionina N-terminal (Met o M). Como sabrán los expertos en

65

la técnica, este residuo puede ser eliminado durante la producción de proteínas recombinantes. Como también será evidente para los expertos en la técnica, puede ser posible truncar las secuencias proporcionadas en el extremo C-terminal y/o N-terminal de las mismas, por 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos, sin afectar sustancialmente a las características de unión del pMHC del TCR, estando abarcadas todas estas variantes por la presente invención.

En la presente memoria, la expresión “región variable” se entiende que abarca todos los aminoácidos de un TCR dado que no están incluidos dentro del dominio constante codificado por el gen TRAC para las cadenas α del TCR y o bien los genes TRBC1 o TRBC2 para las cadenas β del TCR p. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

En la presente memoria, la expresión “dominio variable” se entiende para abarcar todos los aminoácidos de un TCR dado que son codificados por un gen TRAV para las cadenas α del TCR y un gen TRBV para las cadenas β del TCR (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8).

Como es sabido por los expertos en la técnica, parte de la diversidad del repertorio del TCR es debida a las variaciones que se producen en el aminoácido codificado por el codón situado en el límite entre la región variable, tal como se define en la presente memoria, y el dominio constante. Por ejemplo, el codón que está presente en este límite en la secuencia del TCR que se une a Gag del VIH parental tiene como resultado la presencia del residuo de histidina (H) en el extremo C terminal de las secuencias de la región variable de la presente memoria. Esta histidina sustituye al residuo de asparagina (N) N-terminal codificado por el gen TRAC mostrado en la Fig 8a.

Los TCR nativos existen en formas heterodiméricas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Sin embargo, se ha demostrado previamente que los TCR recombinantes que consisten en homodímeros $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$ unen moléculas péptido-MHC.

Los TCR de la invención pueden comprender además la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena alfa mostrada en la Figura 8a (SEQ ID NO: 19) y una de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena beta mostrada en las Figuras 8b y 8c (SEQ ID NO: 20 y 21) o variantes fenotípicamente silenciosas de las mismas.

En la presente memoria, por la expresión “variantes fenotípicamente silenciosas” se entiende que se refiere a aquellos TCR que tienen una K_D para dicho complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 de menos de o igual a $1 \mu\text{M}$ y/o tienen una constante de disociación (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{S}^{-1}$ o más lenta. Por ejemplo, como es conocido por los expertos en la técnica, es posible producir TCR que incorporan cambios menores en el dominio constante y/o en las regiones variables de los mismos en comparación con los que se detallan anteriormente sin alterar la afinidad y/o disociación para la interacción con el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201. Tales variantes triviales están incluidas en el alcance de esta invención. Esos TCR en los que se han hecho una o más sustituciones conservadoras también forman parte de esta invención.

En un aspecto amplio, los TCR de la invención están en la forma de TCR de cadena sencilla (scTCR) o TCR diméricos (dTCR) como se describe en los documentos WO 04/033685 y WO 03/020763.

Una forma de scTCR adecuado comprende un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región variable de la cadena α del TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de la región variable de cadena β del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR y una secuencia enlazadora que une el extremo C terminal del primer segmento con el extremo N terminal del segundo segmento.

Como alternativa, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región variable de la cadena β del TCR, el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de la región variable de la cadena α del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR.

Los scTCR anteriores pueden comprender además un enlace disulfuro entre la primera y segunda cadenas, siendo dicho enlace disulfuro un enlace que no tiene equivalente en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$ nativos y en el que la longitud de la secuencia enlazadora y la posición del enlace disulfuro son tales que la secuencias del dominio variable de los segmentos primero y segundo están orientadas mutuamente sustancialmente como en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$ nativos.

Más específicamente, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de la región variable de la cadena α del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR, el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región variable de la cadena β del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, pudiendo proporcionarse

un enlace disulfuro entre la primera y segunda cadena y siendo dicho enlace disulfuro un enlace que no tiene equivalente en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$ nativos.

5 En las formas scTCR anteriores, la secuencia enlazadora puede conectar el extremo C terminal del primer segmento con el extremo N terminal del segundo segmento y puede tener la fórmula -PGGG-(SGGGG)_n-P- en la que n es 5 o 6 y P es prolina, G es glicina y S es serina.

-PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQ ID NO: 17)
 -PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQ ID NO: 18)

10 Una forma de dTCR adecuado de los TCR de la presente invención comprende un primer polipéptido en el que una secuencia que corresponde a una secuencia de la región variable de la cadena α del TCR está fusionada con el extremo N terminal de una secuencia que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR y un segundo polipéptido en el que una secuencia que corresponde a una secuencia de la región variable de la cadena β del TCR está fusionada con el extremo N terminal de una secuencia que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, estando el primer y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro que no tiene equivalente en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$ nativos.

20 El primer polipéptido puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena α del TCR fusionada con el extremo N terminal de una secuencia que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR y un segundo polipéptido en el que una secuencia que corresponde a una secuencia de la región variable de la cadena β del TCR está fusionada con el extremo N terminal de una secuencia que corresponde a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, estando el primer y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 o su equivalente no humano. ("TRAC" etc. y toda la nomenclatura utilizada en la presente memoria es la utilizada en T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8).

30 La forma dTCR o scTCR de los TCR de la invención puede tener secuencias de aminoácidos que corresponden a las secuencias del dominio constante extracelular del TCR $\alpha\beta$ humano y de la región variable, y un enlace disulfuro puede enlazar restos de aminoácidos de dichas secuencias del dominio constante, no teniendo este enlace disulfuro ningún equivalente en los TCR nativos. El enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína que corresponden a los residuos de aminoácidos cuyos átomos de carbono β están a menos de 0,6 nm de distancia en los TCR nativos, por ejemplo, entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 o su equivalente no humano. Otros sitios donde se pueden introducir cisteínas para formar el enlace disulfuro son los siguientes residuos en el exón 1 de TRAC*01 para la cadena α del TCR y TRBC1*01 o TRBC2*01 para la cadena β del TCR:

Cadena α del TCR	Cadena β del TCR	Separación del carbono β nativo (nm)
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 17	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

40 Además del enlace disulfuro no nativo mencionado anteriormente, la forma dTCR o scTCR de los TCR de la invención puede incluir un enlace disulfuro entre los residuos correspondientes a los conectados por un enlace disulfuro en los TCR nativos.

45 La forma dTCR o scTCR de los TCR de la invención preferiblemente no contiene una secuencia que corresponde a secuencias transmembrana o citoplasmáticas de los TCR nativos.

50 Los TCR de la invención se unen fuertemente al complejo SLYNTVATL-HLA-A2*0201. Estos TCR también se unen a variantes naturales alteradas, pero todavía útiles de SLYNTVATL derivadas de Gag del VIH cuando se carga en HLA-A*0201. Las variantes de SLYNTVATL que han sido aisladas de pacientes con SIDA incluyen las siguientes: (Sewell et al., (1997) Eur J Immunol. 27: 2323-2329):

- SLFNTVATL
- SLFNTVAVL
- 55 SLSNTVATL
- SSFNTVATL
- SLLNNTVATL
- SLYNTIATL
- SLYNTIAVL
- SLFNTIATL
- 60 SLFNTIAVL
- SLFNEVATL

Los aminoácidos mutados se indican subrayados.

Monómeros de TCR PEGilados

5 El TCR de la invención puede estar asociado con al menos una cadena(s) de polialquilenglicol. Esta asociación puede ser de alguna manera conocida por los expertos en la técnica. La cadena(s) de alquileo se puede unir covalentemente al TCR. En una realización adicional las cadenas de polietilenglicol del presente aspecto de la invención comprenden al menos dos unidades repetitivas de polietileno.

10 *Complejos multivalentes de TCR*

Un aspecto de la invención puede proporcionar un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos TCR de la invención. Al menos dos moléculas de TCR pueden estar conectadas a través de restos enlazadores para formar complejos multivalentes. Preferiblemente, los complejos son solubles en agua, por lo que el resto enlazador debe seleccionarse en consecuencia. Además, es preferible que el resto enlazador sea capaz de unirse a las posiciones definidas en las moléculas de TCR, de modo que se minimiza la diversidad estructural de los complejos formados. Puede proporcionarse un complejo de TCR en el que la cadena de polímero o secuencia enlazadora peptídica se extiende entre los residuos de aminoácidos de cada TCR que no se encuentra en una secuencia de la región variable del TCR.

20 Los complejos pueden ser para su uso en medicina, los restos enlazadores deben ser elegidos teniendo en cuenta su idoneidad farmacéutica, por ejemplo su inmunogenicidad.

25 Ejemplos de restos enlazadores que cumplen los criterios deseables anteriores se conocen en la técnica, por ejemplo, en la técnica de unir fragmentos de anticuerpos.

Existen dos clases de enlazador que se prefieren para uso en la producción de moléculas de TCR multivalentes de la presente invención. Un complejo de TCR de la invención en el que los TCR están unidos por una cadena de polialquilenglicol proporciona una realización del presente aspecto.

30 La primera clase son polímeros hidrófilos tales como polialquilenglicoles. El más utilizado de esta clase está basado en polietilenglicol o PEG, cuya estructura se muestra a continuación.



35 En la que n es mayor que dos. Sin embargo, otros están basados en otros polialquilenglicoles adecuados, opcionalmente sustituidos, y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol.

40 Tales polímeros se pueden usar para tratar o conjugar agentes terapéuticos, particularmente agentes terapéuticos de polipéptido o proteína, para conseguir cambios benéficos en el perfil FC del agente terapéutico, por ejemplo, menor depuración renal, mayor semivida plasmática, inmunogenicidad reducida y mayor solubilidad. Tales mejoras en el perfil FC del conjugado PEG-terapéutico se cree que se debe a la formación de la molécula o moléculas de PEG de una 'conchal' alrededor del agente terapéutico que impide estéricamente la reacción con el sistema inmunitario y reduce la degradación proteolítica. (Casey et al, (2000) Tumor Targetting 4 235-244). El tamaño del polímero hidrófilo utilizado puede, en particular, seleccionarse sobre la base del uso terapéutico del complejo TCR pretendido. Hay numerosos artículos de revisión y libros que detallan el uso de PEG y moléculas similares en las formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, véase Harris (1992) Polyethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, Nueva York, NY o Harris & Zalipsky (1997) Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol ACS Books, Washington, D.C.

50 El polímero utilizado puede tener una conformación lineal o ramificada. Las moléculas de PEG ramificadas, o sus derivados, pueden ser inducidas por la adición de restos de ramificación que incluyen glicerol y oligómeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol y lisina.

55 Por lo general, el polímero tendrá un grupo o grupos químicamente reactivos en su estructura, por ejemplo, en uno o ambos extremos terminales y/o en las ramas de la cadena principal, para permitir que el polímero se una a los sitios diana en el TCR. Este grupo o grupos químicamente reactivos pueden estar unidos directamente al polímero hidrófilo o puede haber un grupo/resto espaciador entre el polímero hidrófilo y la química reactiva como se muestra a continuación:

60 Grupo químicamente reactivo – Polímero hidrófilo – Grupo químicamente reactivo

Grupo químicamente reactivo – Espaciador – Polímero hidrófilo – Espaciador – Grupo químicamente reactivo

65 El espaciador utilizado en la formación de las construcciones del tipo descrito anteriormente puede ser cualquier resto orgánico que sea una cadena no reactiva, químicamente estable. Tales espaciadores incluyen, pero no se

limitan a lo siguiente:



5 en la que $n = 2$ a 5



10 Un complejo de TCR en el que se encuentra un radical espaciador divalente de alquileo entre la cadena polialquilenglicol y su punto de unión a un TCR del complejo proporciona una realización adicional del presente aspecto.

15 Se describe un complejo de TCR en el cual la cadena polialquilenglicol comprende por lo menos dos unidades repetitivas de polietilenglicol.

Existen varios proveedores comerciales de polímeros hidrófilos unidos, directamente o por medio de un espaciador, a grupos químicos reactivos que se pueden usar en la presente invención. Estos proveedores incluyen Nektar Therapeutics (CA, EE.UU.), NOF Corporation (Japón), SunBio (Corea del Sur) y Enzon Pharmaceuticals (NJ, EE.UU.).

20 Los polímeros hidrófilos comercialmente disponibles unidos, directamente o por medio de un espaciador, a grupos químicos reactivos que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

Descripción del enlazador de PEG	Fuente de PEG	Número de catálogo
Unión al monómero de TCR		
5K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOHO1
20K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOPO1
20K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20K ramificado (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL2-200MA
30K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
40K ramificado PEG (Maleimida)	Nektar	2D3XOTO1
5K-NP lineal (para la unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10K-NP lineal (para la unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20K-NP lineal (para la unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T
Enlazadores dímero de TCR		
3,4K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2DOFO2
5K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOHOF
10K lineal (con enlazadores ds de ortopiridilo en lugar de maleimida)	Sunbio	
20K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOPOF
20K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	
40K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTOF
Multímeros de TCR de orden superior		
15K, 3 brazos, Mal ₃ (para el trímero)	Nektar	OJOONO3
20K, 4 brazos, Mal ₄ (para el tetrámero)	Nektar	OJOPO4
40 K, 8 brazos, Mal ₈ (para el octámero)	Nektar	OJOOTO8

25 Se puede utilizar una amplia variedad de grupos químicos de acoplamiento para acoplar moléculas de polímero a agentes terapéuticos de proteína y péptido. La elección del grupo químico más apropiado depende en gran medida del sitio de acoplamiento deseado. Por ejemplo, se han usado los siguientes grupos químicos de acoplamiento para unir a uno o más de los extremos de moléculas de PEG (Fuente: Nektar Molecular Engineering Catalogue 2003):

- 30 N-maleimida
 Vinilsulfona
 Carbonato de benzotriazol
 Propionato de succinimidilo
 Butanoato de succinimidilo
 35 Tio-éster

Acetaldehídos
 Acrilatos
 Biotina
 Aminas primarias

5 Como se indicó anteriormente los polímeros no basados en PEG también proporcionan enlazadores adecuados para la multimerización de los TCR de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar restos que contienen extremos de maleimida unidos por cadenas alifáticas tales como BMH y BMOE (Pierce, productos números 22330 y 22323).

10 Enlazadores peptídicos son la otra clase de enlazadores de TCR. Estos enlazadores están compuestos de cadenas de aminoácidos y funcionan para producir enlazadores simples o dominios de multimerización en los que pueden unirse las moléculas de TCR. El sistema de biotina/estreptavidina se ha utilizado previamente para producir tetrámeros de TCR (véase el documento WO/99/60119) para estudios de unión *in vitro*. Sin embargo, la estreptavidina es un polipéptido derivado de microbios y como tal no es ideal para utilizar en un agente terapéutico.

15 Se describe un complejo de TCR en el que los TCR están unidos por un enlazador peptídico derivado de un dominio de multimerización humano.

20 Existen diversas proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que podría ser utilizado en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha utilizado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpo scFv que exhiben una mayor persistencia en suero y una constante de disociación significativamente mayor en comparación con el fragmento scFv monomérico. (Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385- 14392). La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que potencialmente podría ser utilizado para este tipo de aplicación.

25 Se describe un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos TCR, en el que al menos uno de dichos TCR se asocia con un agente terapéutico.

30 Un TCR (o complejo multivalente del mismo) de la presente invención pueden comprender alternativa o adicionalmente una cisteína reactiva en el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas alfa o beta de los mismos.

35 *Uso diagnóstico y terapéutico*

El TCR de la invención puede estar asociado con un agente terapéutico o resto detectable. Por ejemplo, dicho agente terapéutico o resto detectable puede estar unido covalentemente al TCR.

40 Dicho agente terapéutico o resto detectable puede estar unido covalentemente al extremo C-terminal de una o ambas cadenas de TCR.

45 El scTCR o una o ambas de las cadenas del dTCR de los TCR de la presente invención se pueden marcar con un resto detectable, por ejemplo un marcador que es adecuado para propósitos de diagnóstico. Tales TCR marcados son útiles en un método para detectar un complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201, método que comprende poner en contacto el ligando del TCR con un TCR (o un complejo de TCR multimérico de alta afinidad) que es específico para el ligando de TCR y detectar la unión al ligando de TCR. En los complejos de TCR tetraméricos formados, por ejemplo, usando heterodímeros biotinilados, se puede utilizar estreptavidina fluorescente para proporcionar un marcador detectable. Tal tetrámero de TCR marcado con fluorescencia es adecuado para su uso en el análisis FACS, por ejemplo, para detectar células presentadoras de antígenos que llevan el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 para el que estos TCR de alta afinidad son específicos.

50 Otra manera en la que se pueden detectar los TCR solubles de la presente invención es mediante el uso de anticuerpos específicos del TCR, en particular anticuerpos monoclonales. Hay muchos anticuerpos anti-TCR comercialmente disponibles, tales como α F1 y β F1, que reconocen los dominios constantes de las cadenas α y β , respectivamente.

55 Un TCR (o complejo multivalente del mismo) de la presente invención puede alternativa o adicionalmente estar asociado con (por ejemplo, covalentemente o de otro modo unido a) un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un resto tóxico para su uso en la destrucción de células, o una molécula efectora inmunitaria tal como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede tener una mayor capacidad de unión para un ligando de TCR en comparación con un heterodímero de receptor de linfocitos T de tipo natural no multimérico de la invención. Por lo tanto, los complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención son particularmente útiles para el seguimiento o direccionamiento a las células que presentan complejos de SLYNTVATL-HLA-A*0201 *in vitro* o *in vivo* y también son útiles como intermedios para la producción de otros complejos multivalentes de TCR que tienen tales usos. Por tanto, estos TCR o complejos de TCR multivalentes pueden proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para su uso *in vivo*.

Se describe un método para administrar un agente terapéutico a una célula diana, método que comprende poner en contacto posibles células diana con un TCR o un complejo de TCR multivalente en condiciones para permitir la unión del TCR o complejo de TCR multivalente a la célula diana, siendo dicho TCR o complejo de TCR multivalente específico del complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 y que tiene el agente terapéutico asociado.

En particular, el TCR o complejo de TCR multivalente soluble se puede utilizar para administrar agentes terapéuticos a la localización de las células que presentan un antígeno particular. Esto sería útil en muchas situaciones y, en particular, contra las células infectadas por el VIH. Un agente terapéutico podría ser administrado de forma que ejerciese su efecto localmente, pero no solo sobre la célula a la que se une. Por lo tanto, una estrategia particular prevé moléculas citotóxicas o inmuno-estimuladoras unidas a TCR o complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención específicos del complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201.

Para este uso podrían emplearse muchos agentes terapéuticos, por ejemplo, compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (cisplatino, por ejemplo). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejercen en el lugar deseado, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido a estreptavidina de modo que el compuesto se libera lentamente. Esto evitará efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y garantiza que la toxina tiene un efecto máximo después de la unión del TCR a las correspondientes células presentadoras de antígeno.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de destruir células de mamífero que tienen un peso molecular de menos de 700 dalton. Tales compuestos podrían también contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, se entiende que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas liberando los agentes citotóxicos. Ejemplos de tales agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, rachelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, Photofrin® porfimer sódico, temozolmida, topotecán, glucuronato trimetreato, auristatina E vincristina y doxorubicina;
- citotoxinas péptidos, es decir, proteínas o fragmentos de los mismos con la capacidad de destruir células de mamífero. Incluyendo, pero sin limitarse a, ricina, toxina de la difteria, exotoxina A bacteriana de *Pseudomonas* A, ADNasa y ARNasa;
- radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se desintegran con la emisión simultánea de una o más partículas α o β o rayos γ , incluyendo pero sin limitarse a, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astato 213; se pueden utilizar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos con TCR de alta afinidad o multímeros de los mismos;
- profármacos, incluyendo pero sin limitarse a, profármacos enzimas dirigidos a anticuerpos;
- inmunoestimulantes, es decir, restos que estimulan la respuesta inmunitaria, incluyendo, pero sin limitarse a, citocinas tales como IL-2 e IFN, superantígenos y sus mutantes, fusiones TCR-HLA y quimiocinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanomas, etc., anticuerpos o fragmentos de los mismos, activadores del complemento, dominios de proteínas xenogénicas, dominios de proteínas alogénicas, dominios de proteínas virales/bacterianas, péptidos virales/bacterianos y anticuerpos anti-determinante de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD3 o anti-CD28) o análogos de anticuerpos tales como Nanobodies™ y Affybodies™.

Los TCR o complejos de TCR multivalentes solubles pueden unirse a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco únicamente en el sitio donde se requiere (es decir, dirigido por el sTCR).

Se espera que el SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16)-HLA-A*0201 de alta afinidad específico del TCR divulgado en la presente memoria pueda utilizarse en métodos para el diagnóstico y el tratamiento del SIDA.

Para el tratamiento, la localización del agente terapéutico en la vecindad de las células (CD4⁺) infectadas por el VIH aumentaría el efecto de las toxinas o de los inmunoestimulantes. Para la administración de vacunas, el antígeno vacunal podría localizarse en la vecindad de las células presentadoras de antígenos, mejorando así la eficacia del antígeno. El método también se puede aplicar con fines de estudios de imagen.

En la presente memoria se describe una preparación de membrana que comprende un TCR de la invención. Dicha preparación de membrana se puede preparar a partir de células o puede comprender una membrana sintética.

En la presente memoria se describe una célula que alberga un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. Por ejemplo, dicha célula puede ser un linfocito T.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende:

un TCR o un complejo de TCR multivalente (opcionalmente asociado con un agente terapéutico) o una preparación de membrana que comprende un TCR, o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En la presente memoria se describe un método de tratamiento del SIDA que comprende administrar a un sujeto que sufre SIDA una cantidad eficaz de un TCR o un complejo de TCR multivalente, o una preparación de membrana que comprende un TCR, o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. Se describe el uso de un TCR o un complejo de TCR multivalente, o una
10 preparación de membrana que comprende un TCR de la invención, o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, en la preparación de una composición para el tratamiento del SIDA. Se describen otros usos y métodos en los que el TCR o complejo multivalente de TCR, o una preparación de membrana que comprende un TCR se administran en una forma que está asociada con un agente terapéutico. Las células que albergan un vector de expresión que comprende ácido
15 nucleico que codifica un TCR de la invención pueden ser linfocitos T CD8⁺.

Los TCR terapéuticos o para los estudios de imagen, por lo general, se administran como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del método deseado de administración a un
20 paciente). Se puede proporcionar en forma de forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionará en un envase sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Tal kit normalmente (aunque no necesariamente) incluiría instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

Sin desear estar limitado por la teoría, se espera que los TCR de la invención proporcionen agentes dirigidos eficaces capaces de administrar agentes terapéuticos tales como inmunoestimulantes y/o agentes citotóxicos a células (CD4⁺) infectadas con el VIH. En particular, se espera que la administración de los TCR de la presente invención cuando están asociados con inmunoestimulantes y/o agentes citotóxicos en combinación con terapias de fármacos antirretrovirales convencionales y/o tratamiento con IL-2 sean capaces de dirigirse a las células infectadas
25 por el VIH.

30 La siguiente es una lista de fármacos antirretrovirales aprobados actualmente para su uso en los EE.UU.:

Agenerase (amprenavir) - inhibidor de la proteasa
35 Combivir: combinación de Retrovir (300 mg) y Epivir (150 mg)
Crixivan (indinavir) - inhibidor de la proteasa
Epivir (3TC/lamivudina) - inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
Epzicom (una combinación de 2 inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI en la misma pastilla; 600 mg de Ziagen (abacavir) y 300 mg de Epivir (3TC).
40 Emtriva [emtricitabina (FTC)]
Fortovase (saquinavir) - inhibidor de la proteasa
Fuzeon (enfuvirtida) - inhibidor de la fusión
Hivid (DDC/zalcitabina) - inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
Invirase (saquinavir) - inhibidor de la proteasa
45 Kaletra (lopinavir) - inhibidor de la proteasa
Lexiva (fosamprenavir) - inhibidor de la proteasa aprobado el 20/10/03
Norvir (ritonavir) - inhibidor de la proteasa
Rescriptor (delavirdina) - inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido
Retrovir, AZT (zidovudina) - inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
50 Reyataz (atazanavir; BMS-232632) - inhibidor de la proteasa
Sustiva (efavirenz) - inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido
Trizivir (3 no nucleósidos en un comprimido; abacavir + zidovudina + lamivudina
Truvada (emtricitabina + tenofovir DF)
Videx (ddI/didanosina) inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
Videx EC; (DDL/didanosina) inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
55 Viracept (nelfinavir) - inhibidor de la proteasa
Viramune (nevirapina) – inhibidor de transcriptasa inversa no análogo de nucleósido
Viread (tenofovir disoproxil fumarato) inhibidor de la transcriptasa inversa nucleotídico
(Clase de la adenosina)
Zerit (d4T/estavudina) - inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido
60 Ziagen (abacavir) - inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido.

La composición farmacéutica puede adaptarse para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, parenteral, transdérmica o mediante inhalación, preferiblemente una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, o, lo más preferiblemente intravenosa). Tales composiciones se pueden preparar por cualquier
65 método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo, mezclando el principio activo con el vehículo(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

Las dosis de las sustancias pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y estado del individuo a tratar, etc., y un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas a utilizar.

5 **Aspectos adicionales**

10 Un scTCR o dTCR (que preferentemente está constituido por secuencias constantes y variables correspondientes a secuencias humanas) de la presente invención se pueden proporcionar en forma sustancialmente pura, o como una preparación purificada o aislada. Por ejemplo, se puede proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de otras proteínas.

15 La secuencia(s) del ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican para los TCR de la invención puede alterarse con el fin de optimizar el nivel de expresión obtenido en la célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota adecuada. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula *E. coli* o un linfocito T humano. Las modificaciones introducidas en estas secuencias genéticas son silentes, es decir que no alteran la secuencia de aminoácidos codificada. Hay una serie de empresas que ofrecen este tipo de servicios de optimización de la expresión, incluyendo, GeneArt, Alemania.

20 En la presente memoria se describe un método para producir un TCR de alta afinidad que tiene la propiedad de unirse a SLYNTVATL-HLA-A*0201 caracterizado porque el TCR (i) comprende al menos un dominio variable de la cadena α del TCR y/o al menos un dominio variable de la cadena β del TCR y (ii) tiene una K_D para el dicho complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 de menos de o igual a $1 \mu\text{M}$ y/o una constante de disociación (K_{off}) para el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ o más lenta, método que comprende:

- 25 (a) la producción de un TCR que comprende los dominios variables de la cadena α y β del TCR específico de Gag del VIH parental, en el que uno o ambos de los dominios variables de la cadena α y β comprenden una mutación(es) en uno o más de los aminoácidos identificados en las reivindicaciones 7 y 8;
- 30 (b) poner en contacto dicho TCR mutado con SLYNTVATL-HLA-A*0201 en condiciones adecuadas para permitir la unión del TCR a SLYNTVATL-HLA-A*0201;

y medir la K_D y/o K_{off} de la interacción.

35 Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*. Los documentos de la técnica anterior mencionados en la presente memoria se incorporan en la medida en que lo permita la ley.

Ejemplos

40 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

A continuación se hace referencia a los dibujos que se acompañan en los que:

45 La Figura 1a y 1b detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa y del dominio variable de la cadena beta del TCR específico de Gag del VIH parental, respectivamente.

Las Figuras 2a y 2b muestran, respectivamente, la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas α y β del TCR específico de Gag del VIH parental.

50 Las Figuras 3a y 3b muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de la cadena α y β del TCR específico de Gag del VIH de las secuencias de ADN de las Figuras 2a y 2b.

55 Las Figuras 4a y 4b muestran, respectivamente, la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas α y β de del TCR específico de Gag del VIH mutada para codificar residuos de cisteína adicionales para formar un enlace disulfuro no nativo. El codón mutado se indica mediante el sombreado y los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción introducidos están subrayados.

60 Las Figuras 5a y 5b muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de la cadena α y β del TCR específico de Gag del VIH producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b. La cisteína introducida en cada cadena se indica mediante el sombreado.

La Figura 6 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de las variantes del TCR específico de Gag del VIH de alta afinidad.

65 La Figura 7 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de las variantes del TCR específico de Gag del VIH de alta afinidad.

- La Figura 8a detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRAC.
- La Figura 8b detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRBC1.
- 5 La Figura 8c detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRBC2.
- La Figura 9 detalla la secuencia de ADN del plásmido pEX954.
- 10 La Figura 10 detalla la secuencia de ADN del plásmido pEX821.
- La Figura 11 detalla las secuencias de aminoácidos de la cadena beta de la variante del TCR específico de Gag del VIH soluble parental fusionado mediante un enlazador péptido a la IL-2 humana de tipo natural. Los aminoácidos del enlazador y la IL-2 se indican en cursiva.
- 15 La Figura 12 proporciona las curvas de respuesta Biacore generadas por la interacción del TCR específico de Gag del VIH parental unido por disulfuro soluble y el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201.
- La Figura13 proporciona un mapa plasmídico del plásmido pEX954.
- 20 La Figura 14 proporciona un mapa plasmídico del plásmido pEX821.
- La Figura 15a proporciona la secuencia de ADN de longitud completa de la cadena α del TCR específico de Gag del VIH parental optimizada para la expresión en linfocitos T humanos.
- 25 La Figura 15b proporciona la secuencia de ADN de longitud completa de la cadena β del TCR específico de Gag del VIH parental optimizada para la expresión en linfocitos T humanos.
- La Figura 16a proporciona la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena α del TCR específico de Gag del VIH parental.
- 30 La Figura 16b proporciona la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena β del TCR específico de Gag del VIH optimizada para la expresión en linfocitos T humanas.
- La Figura 17a proporciona los datos del análisis de FACS para linfocitos T CD8⁺ control no transducidos.
- 35 La Figura 17b proporciona los datos del análisis de FACS que demuestran la expresión del TCR específico de Gag del VIH en la superficie de linfocitos T CD8⁺ transducidos.
- Las Figuras 18a y 18b proporcionan las secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa y beta de un TCR específico de Gag del VIH unido por disulfuro soluble de alta afinidad c11c6.
- 40 La Figura 19 demuestra la capacidad de los TCR específico de Gag del VIH unidos por disulfuro solubles de alta afinidad c11c6 para inhibir la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva a SLYNTVATL-HLA-A*0201 en presencia de linfocitos T infectados con el VIH, medido por la producción de IFN- γ y la producción de TNF- α .
- 45 La Figura 20 demuestra la capacidad de los TCR específicos de Gag del VIH unidos por disulfuro solubles de alta afinidad c11c6 para inhibir la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva a SLYNTVATL-HLA-A*0201 en presencia de linfocitos T no infectados pulsadas con péptido SLYNTVATL pulsadas con péptido no infectadas a las células, medido por la producción de IFN- γ y la producción de TNF- α .
- 50 La Figura 21 demuestra la capacidad de los TCR específicos de Gag del VIH unidos por disulfuro solubles de alta afinidad c11c6 para teñir linfocitos T2 pulsados con péptido SLYNTVATL.
- 55 *Ejemplo 1 - Producción de TCR unidos por disulfuro solubles que comprenden las regiones variables de TCR específicos de Gag del VIH parental*
- Las Figuras 4a y 4b proporcionan las secuencias de ADN de las cadenas alfa y beta unidas por disulfuro solubles de un TCR parental que es específico para el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201. Estas secuencias de ADN pueden ser de síntesis de novo obtenidas por una serie de empresas de investigación por contrato, por ejemplo GeneArt (Alemania). Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción también se añaden a estas secuencias de ADN con el fin de facilitar la ligación de estas secuencias de ADN en los plásmidos de expresión basados en pGMT7, que contienen el promotor T7 para la expresión de alto nivel en la cepa de *E. coli* BL21-DE3 (pLysS) (Pan et al, Biotechniques (2000) 29 (6):1234-8)
- 60
- 65

Las secuencias de la cadena alfa del TCR contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *ClaI* y *SallI* introducidos y esta secuencia se ligó en pEX954 (ver las Figuras 9 y 13) cortado con *ClaI* y *XhoI*.

5 Las secuencias de la cadena beta del TCR contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *AseI* y *AgeI* introducidos y ligados en pEX821 (ver las Figuras 10 y 14) cortado con *NdeI*/*AgeI*.

Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción como se introdujeron en el ADN que codifica las cadenas del TCR

10 *ClaI*- ATCGAT
SallI- GTCGAC
AseI- ATTAAT
AgeI- ACCGGT

15 *Ligación*

El ADN de la cadena alfa y beta del TCR cortado y el vector cortado se ligaron usando un kit de ligación de ADN rápido (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 Los plásmidos ligados se transformaron en células de *E. coli* cepa XL1-blue competentes y se sembraron sobre placas de LB/agar que contienen 100 mg/ml de ampicilina. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron las colonias individuales y se cultivaron en 10 ml de LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina durante la noche a 37 °C con agitación. Los plásmidos clonados se purificaron usando un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuenció usando un secuenciador de ADN automático (Lark Technologies).

25 Las Figuras 5a y 5b muestran, respectivamente, las secuencias de aminoácidos extracelulares de la cadena α y β del TCR específico de Gag del VIH producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b.

30 *Ejemplo 2 - Producción de variantes de alta afinidad del TCR específico de Gag del VIH unido por disulfuro soluble*

El TCR específico de Gag del VIH nativo unido por disulfuro soluble producido como se describe en el Ejemplo 1 puede utilizarse como una plantilla a partir de la cual producir los TCR de la invención que tienen una mayor afinidad por el complejo SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16)-HLA-A*0201.

35 La presentación en fagos es un medio por el que se pueden generar bibliotecas de variantes de TCR específico de Gag del VIH con el fin de identificar mutantes de alta afinidad. Por ejemplo, la presentación en fagos de los TCR y los métodos de cribado descritos en (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) pueden ser adaptados y aplicados a los TCR específicos de Gag del VIH.

40 Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena alfa y beta del TCR mutadas que, cuando se combinan con una cadena de TCR apropiada, demuestran una alta afinidad para el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201, se enumeran en las Figuras 6 y 7 respectivamente. (SEQ ID Nos: 11-13 y 14-15 respectivamente). Como es conocido para los expertos en la técnica, los cambios de codón necesarios requeridos para producir estas cadenas mutadas se pueden introducir en el ADN que codifica estas cadenas por mutagénesis dirigida al sitio. (kit QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis de Stratagene)

Brevemente, esto se consigue mediante el uso de cebadores que incorporan el cambio de codón(es) deseado y los plásmidos que contienen el ADN de cadena del TCR relevante como molde para la mutagénesis:

50 La mutagénesis se llevó a cabo usando las siguientes condiciones: 50 ng de molde de plásmido, 1 μ l de dNTP 10 mM, 5 μ l de 10x tampón de ADN polimerasa Pfu como se suministra por el fabricante, 25 pmol de cebador directo, 25 pmol de cebador inverso, 1 μ l de ADN polimerasa pfu en el volumen total 50 μ l. Después de una etapa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, la reacción se sometió a 25 ciclos de desnaturalización (95 °C, 10 segundos), hibridado (55 °C 10 segundos) y elongación (72 °C, 8 mins). El producto resultante se digirió con la enzima de restricción DpnI para eliminar el plásmido del molde y se transformó en la cepa de *E. coli* XL1-blue. La mutagénesis se verificó mediante secuenciación.

Ejemplo 3 - Expresión, replegamiento y purificación del TCR soluble

60 Los plásmidos de expresión que contienen la cadena α y la cadena β mutadas respectivamente como se ha preparado en los Ejemplos 1 o 2 se transformaron por separado en *E. coli* cepa BL21pLysS y las colonias individuales resistentes a la ampicilina se cultivaron a 37 °C en medio TYP (ampicilina 100 μ g/ml) a DO₆₀₀ de 0,4 antes de inducir la expresión de las proteínas con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción mediante centrifugación durante 30 minutos a 4.000 rpm en un Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM, sacarosa 25 % (p/v), EDTA Na 1 mM, Azida Na 0,1 % (p/v), DTT 10 mM, pH 8,0. Después de una etapa de congelación-descongelación durante la noche, las células

resuspendidas se sometieron a ultrasonidos en ráfagas de 1 minuto durante un total de aproximadamente 10 minutos en un sonicador Milsonix XL2020 usando una sonda estándar de 12 mm de diámetro. Los sedimentos de los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13.000 rpm en una centrifuga Beckman J2-21. A continuación se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los desechos celulares y los componentes de la membrana. Cada vez el sedimento de los cuerpos de inclusión se homogeneizó en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM, Triton-X100 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM, 0,1 % (p/v) Azida Na, DTT 2 mM, pH 8,0) antes de sedimentarse por centrifugación durante 15 minutos a 13.000 rpm en un Beckman J2-21. El detergente y la sal se separó después por un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM, EDTA Na 1 mM, Azida Na 0,1 % (p/v), DTT 2 mM, pH 8,0. Por último, los cuerpos de inclusión se dividen en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento de proteínas de los cuerpos de inclusión se cuantificó mediante solubilización con guanidina 6M-HCl y medición con un ensayo de unión a colorante de Bradford (PerBio).

Aproximadamente 30 mg de cuerpos de inclusión solubilizados de la cadena β del TCR y 60 mg de la cadena α del TCR se descongelaron de las existencias congeladas, las muestras se mezclaron a continuación y la mezcla se diluyó en 15 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6M, acetato sódico 10 mM, EDTA 10 mM), para asegurar la completa desnaturalización de la cadena. La solución de guanidina que contiene las cadenas de TCR totalmente reducidas y desnaturalizadas se inyectó en 1 litro del siguiente tampón de replegamiento: Tris 100 mM pH 8,5, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, urea 5M, PMSF 0,2 mM. Se añadió el par redox (2-mercaptoetilamina y cistamina (hasta concentraciones finales de 6,6 mM y 3,7 mM, respectivamente) aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La solución se dejó durante 5 horas \pm 15 minutos. El TCR replegado se dializó en una membrana Spectrapor 1 (Spectrum; Producto N.º 132670) contra 10 l de Tris 10 mM pH 8,1 a 5 °C \pm 3 °C durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió a Tris 10 mM pH 8,1 fresco (10 l) y la diálisis se continuó a 5 °C \pm 3 °C durante otras 20-22 horas.

El sTCR se separó de los productos de degradación e impurezas cargando el replegamiento dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM de más de 50 volúmenes de columna utilizando un purificador Akta (Pharmacia). Las fracciones de los picos se almacenaron a 4 °C y se analizaron por SDS-PAGE con tinción de Coomassie antes de ser agrupadas y concentradas. Por último, el sTCR se purificó y caracterizó usando una columna de filtración en gel Superdex 200HR pre-equilibrada en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,5 mM, Nonidet P40 0,05 %). El pico que eluye a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se reunió y se concentró antes de caracterización por análisis de resonancia de plasmón superficial BIACore.

Ejemplo 4 - Caracterización por resonancia de plasmón de superficie Biacore de la unión del sTCR unión al pMHC específico

Se usó un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (Biacore 3000 TM) para analizar la unión de un sTCR a su ligando péptido-MHC. Esto se facilitó mediante la producción de complejos de pMHC individuales (descritos más adelante) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de un modo semi-orientado, lo que permite demostrar eficientemente la unión de un receptor de linfocitos T soluble a hasta cuatro diferentes pMHC (inmovilizados en células de flujo separadas) simultáneamente. La inyección manual del complejo HLA permite manipular fácilmente el nivel preciso de moléculas de clase I a ser inmovilizadas.

Se replegaron *in vitro* moléculas de HLA-A*0201 de clase I biotiniladas de cuerpos de inclusión expresados por bacterias que contienen las proteínas de la subunidad constituyente y péptido sintético, seguido por purificación y biotinilación enzimática *in vitro* (O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266:9-15). La cadena pesada de HLA-A*0201 se expresó con una etiqueta de biotinilación C-terminal que sustituye a los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína en una construcción apropiada. Se obtuvieron niveles de expresión del cuerpo de inclusión de ~ 75 mg/litro de cultivo bacteriano. La cadena ligera de MHC o microglobulina β 2 también se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de una construcción adecuada, a un nivel de ~ 500 mg/litro de cultivo bacteriano.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purificaron a aproximadamente 80 % de pureza. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturalizó en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM y se replegó a una concentración de 30 mg/litro de la cadena pesada, 30 mg/litro de β 2 en L-Arginina-HCl 0,4 M, Tris 100 mM pH 8,1, cistamina 3,7 mM, β -cisteamina 6,6 mM, 4 mg/ml del péptido SLYNTVATL requerido para ser cargado por la molécula de HLA-A*0201, por adición de un pulso único de proteína desnaturalizada en tampón de replegamiento a <5 °C. El replegamiento se dejó hasta la terminación a 4 °C durante al menos 1 hora.

El tampón se intercambiaba mediante diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM pH 8,1. Se necesitaron dos cambios de tampón para reducir la fuerza iónica de la solución suficientemente. A continuación, la solución de proteína se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 1,5 μ m y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ (volumen de lecho 8 ml). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM. El complejo HLA-

A*0201-péptido eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM y se recogieron las fracciones de los picos, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Se intercambió el tampón a las moléculas de pMHC etiquetadas por biotilación a Tris 10 mM pH 8,1, NaCl 5 mM usando una columna de desalación rápida de Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contienen proteínas se enfriaron en hielo y se añadió un cóctel inhibidor de la proteasa (Calbiochem). A continuación, se añadieron los reactivos de biotilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8), $MgCl_2$ 7,5 mM, y 5 $\mu g/ml$ de enzima BirA (purificada de acuerdo con O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266:9-15). Después se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche.

Las moléculas de pHLA-A*0201 biotiniladas se purificaron usando cromatografía de filtración en gel. Se pre-equilibró una columna Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción de biotilación y la columna se desarrolló con PBS a 0,5 ml/min. Las moléculas de pHLA-A*0201 biotiniladas eluyeron como un único pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se agruparon, se enfriaron en hielo y se añadió cóctel de inhibidor de la proteasa. La concentración de proteína se determinó usando un ensayo de unión Coomassie (PerBio) y las alícuotas de moléculas de pHLA-A*0201 biotiniladas se almacenaron congeladas a -20 °C. La estreptavidina se inmovilizó por métodos de acoplamiento de amina estándar.

Tales complejos inmovilizados son capaces de unirse tanto a receptores de linfocitos T como al correceptor CD8 $\alpha\alpha$, los cuales pueden ser inyectados en la fase soluble de unión. La unión específica de TCR se obtiene incluso a bajas concentraciones (por lo menos 40 $\mu g/ml$), lo que implica que el TCR es relativamente estable. Las propiedades de unión a pMHC del sTCR observadas son cualitativa y cuantitativamente similares si se utiliza sTCR, ya sea en la fase soluble o inmovilizada. Este es un control importante de la actividad parcial de especies solubles y también sugiere que los complejos de pMHC biotinilados son biológicamente tan activos como los complejos no biotinilados.

Las interacciones entre el sTCR específico de Gag del VIH que contiene un novedoso enlace entre cadenas y su ligando/complejo de MHC o una combinación de HLA-péptido irrelevante, cuya producción se describe anteriormente, se analizaron en un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) Biacore 3000™. El SPR mide los cambios en el índice de refracción expresado en unidades de respuesta (RU) cerca de una superficie de sensor dentro de una pequeña celda de flujo, un principio que se puede utilizar para detectar interacciones ligando-receptor y para analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Las células de flujo de la sonda se prepararon mediante inmovilización de los complejos individuales HLA-péptido en células de flujo separadas mediante la unión entre la biotina reticulada en $\beta 2m$ y estreptavidina que han sido químicamente reticuladas a la superficie activada de las células de flujo. A continuación, el ensayo se realizó haciendo pasar sTCR sobre las superficies de las diferentes células de flujo a un caudal constante, midiendo a la vez la respuesta SPR.

Medición de la constante de unión en el equilibrio

Se prepararon diluciones en serie del sTCR específico de Gag del VIH parental o mutado y se inyectaron a una velocidad de flujo constante de 5 $\mu l \text{ min}^{-1}$ sobre dos células de flujo diferentes; una recubierta con ~ 1000 RU de complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 específico y la segunda recubierta con ~ 1000 RU de complejo HLA-A2-péptido no específico. La respuesta se normalizó para cada concentración utilizando la medición de la célula de control. La respuesta de datos normalizada se representó gráficamente frente a la concentración de la muestra de TCR y se ajustó a una hipérbola con el fin de calcular constante de unión en el equilibrio K_D . (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª Edición) 1979, Clarendon Press, Oxford).

Medición de los parámetros cinéticos

Para los TCR de alta afinidad, la K_D se determinó midiendo experimentalmente la constante de velocidad de disociación, k_d , y la constante de velocidad de asociación, k_a . La constante en el equilibrio K_D se calculó como k_d/k_a .

El TCR se inyectó sobre dos células diferentes, una recubierta con ~ 300 RU de complejo HLA-A2-péptido NY-ESO específico y la segunda recubierta con ~ 300 RU de complejo HLA-A2-péptido no específico. El caudal se fijó en 50 $\mu l/min$. Generalmente se inyectaron 250 μl de TCR a una concentración de ~ 3 μM . A continuación, el tampón se hizo fluir encima hasta que la respuesta regresó a la línea base. Los parámetros cinéticos se calcularon usando el software BIAevaluation. La fase de disociación también se ajustó a una ecuación de desintegración simple que permite el cálculo de la semivida.

Resultados

La interacción entre un TCR específico de Gag del VIH nativo unido por disulfuro soluble (que consta de las cadenas del TCR α y β detalladas en las SEQ ID NO 9 y 10 respectivamente) y el complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 se analizó mediante los métodos anteriores y se determinó una K_D de 85 nM y una constante de disociación (k_{off}) de $2,21 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$. (Véase la Figura 12 para las curvas de respuesta Biacore)

Los TCR especificados en la siguiente tabla tienen una K_D de menos de o igual a $1 \mu M$ y/o un k_{off} de $1 \times S^{-1}$ o más lento.

Secuencia del dominio variable de la cadena alfa, SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de la cadena beta, SEQ ID NO:
1	2
1	14
1	15
11	2
12	2
13	2
12	15
13	15
12	14
13	14

5 *Ejemplo 5 - Producción de la proteína de fusión TCR específico de Gag del VIH de alta afinidad soluble - IL-2 humana natural.*

Los métodos sustancialmente como se describe en los Ejemplos 1 a 3 se pueden utilizar para producir una proteína de fusión TCR específico de Gag del VIH de alta afinidad soluble - IL-2 humana natural. Brevemente, el ADN que codifica el enlazador deseado y la IL-2 humana natural se añaden en el extremo 3' de la secuencia de ADN de la cadena beta del TCR específico de Gag del VIH parental unido por disulfuro soluble inmediatamente antes del codón TAA ("parada"). La Figura 11 proporciona la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende una cadena beta del TCR específico de Gag del VIH parental unido por disulfuro fusionada a la IL-2 humana natural a través de una secuencia enlazadora (SEQ ID NO: 24). El enlazador y la porción de IL-2 de esta proteína de fusión se indican en cursiva. El ADN que codifica esta construcción se puede ligar a continuación en pEX821. La proteína de fusión TCR específico de Gag del VIH parental soluble - IL-2 se puede expresar a continuación mediante la combinación de esta proteína de fusión de la cadena beta con la cadena alfa del TCR específico de Gag del VIH parental unido por disulfuro soluble detallada en la Figura 5a (SEQ ID NO: 9), utilizando los métodos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 3.

20 *Ejemplo 6 - Expresión recombinante del TCR específico de Gag del VIH parental en la superficie de linfocitos T.*

Se sintetizaron construcciones de ADN que codifican para la secuencia señal, dominios extracelular, transmembrana e intracelular de las cadenas de TCR específico de Gag del VIH parental (GeneArt, Alemania). Estas secuencias de ADN de la cadena α del TCR y de la cadena β del TCR, proporcionadas en las Figuras 15a y 15b, respectivamente, son alteradas respecto de las secuencias de ADN del TCR específico de Gag del VIH parental con el fin de mejorar los niveles de expresión de las cadenas de TCR codificadas en los linfocitos T humanos, a la vez que se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Las Figuras 16a y 16b proporcionan las secuencias de aminoácidos de longitud completa codificadas por las secuencias de ADN de las Figuras 15a y 15b, respectivamente.

30 A continuación, se insertaron juntas las secuencias de ADN de la cadena α del TCR y de la cadena β de TCR en un vector de expresión Lentiviral. Este vector contiene el ADN que codifica tanto para la cadena α como para la cadena β del TCR específico de Gag del VIH parental como un único marco de lectura abierto con la secuencia de aminoácidos del factor de escisión del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV) 2A (LLNFDLLKLAGDVESNPG (SEQ ID NO: 31)) en el marco separando las cadenas de TCR. (De Felipe et al, Genet Vaccines Ther (2004) 2(1):13). En la traducción del ARNm se produce la cadena α del TCR con la secuencia del péptido 2A en su extremo C-terminal y la cadena β del TCR se produce como un polipéptido separado.

40 Los linfocitos T se transdujeron con el vector lentiviral anterior. En resumen, se estimularon los linfocitos T primarios durante 24 horas usando perlas anti-CD3/anti-CD28. Se incubó un sobrenadante de Lentivirus concentrado, que expresa los genes de TCR, con los linfocitos T estimulados para permitir la transducción viral. Las perlas de anti-CD3/anti-CD28 se retiraron a continuación y los linfocitos T transducidos se cultivaron hasta que alcanzaron un "volumen de reposo" de 200 a 300 fl.

45 La presentación de los TCR específicos de Gag del VIH parentales en la superficie de los linfocitos transducidos se confirmó por análisis FACS utilizando el tetrámero HLA-A*0201-SLYNTVALT PE y la co-tinción con FITC del anticuerpo monoclonal anti-CD8.

Resultados

La Figura 17b proporciona los datos de análisis FACS que demuestran la expresión con éxito del TCR específico de Gag del VIH parental en la superficie de linfocitos T CD8⁺ transducidos. La Figura 17a proporciona los datos del análisis FACS generados utilizando linfocitos T no transducidos de control.

Ejemplo 7 - Inhibición de la activación de CTL por TCRs específicos de Gag del VIH de alta afinidad solubles

Los siguientes ensayos se llevaron a cabo para demostrar que el TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble era capaz de inhibir la activación de una línea de linfocitos T policlonal reactiva con SLYNTVATL-HLA-A*0201.

*Inhibición de la activación de la línea de linfocitos T policlonal reactiva con SLYNTVATL-HLA-A*0201 OX84 en la presencia de células infectadas por VIH*

El TCR específico de Gag del VIH de alta afinidad c11c6 soluble utilizado en este experimento contenía las regiones variables del dominio de la cadena alfa del TCR y de la cadena beta del TCR que se muestran en la Figura 6c (SEQ ID NO: 13) y la Figura 7b (SEQ ID NO: 15), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas alfa y beta del TCR de este TCR soluble se proporcionan en la Figura 18a (SEQ ID NO: 29) y la Figura 18b (SEQ ID NO: 30), respectivamente.

La producción de IFN- γ y TNF- α se utilizó como lecturas de la activación de CTL.

Reactivos

Medios de ensayo R10: FCS 10 % (inactivado por calor, Gibco, número de catálogo 10108-165), RPMI 88 % 1640 (Gibco, número de catálogo 42401-018), glutamina 1 % (Gibco, número de catálogo 25030-024) y penicilina/estreptomicina 1 % (Gibco, número de catálogo 15070-063).

Péptido: (obtenido de diversas fuentes) disuelto inicialmente en DMSO (Sigma, número de catálogo D2650) a 4 mg/ml y congelado.

BD™ Cytometric Bead Array Kit, Human Th1/Th2 cytokine Kit II (BD Biosciences, San Diego, EE.UU.) contiene todos los reactivos necesarios para el ensayo.

Ensayo de activación de linfocitos T

Linfocitos T diana con infección crónica por el VIH (cepas de laboratorio HXB2 y HIV3B del VIH) se lavaron y se volvieron a suspender en medios R10. Como control, linfocitos T diana no infectados pulsados con 1 nM de péptido SLYNTVATL, durante 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂.

Muestras de ensayo:

25.000 linfocitos T diana infectados por el VIH en medios R10 por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U.

TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad 2×10^{-7} M o TCR específico de Gag del VIH parental en medios R10 por pocillo.

5.000 linfocitos de la línea de linfocitos T efectora policlonal OX84 en medios R10 por pocillo.

Controles:

Como el anterior sustituyendo los TCR solubles irrelevantes (TCR específico de HLA-A*0201-Tax y específico de HLA-A*0201-NY-ESO) o los TCR específicos de Gag del VIH de alta afinidad.

A continuación, la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. El sobrenadante del cultivo se eliminó para medir los niveles de IFN- γ y TNF- α presentes utilizando el siguiente método.

Ensayo de IFN- γ y TNF- α

Se prepararon perlas citométricas BD™ recubiertas con (A) anticuerpos de captura anti-IFN γ y (b) anticuerpos de captura anti-TNF α según las instrucciones del fabricante.

A continuación se preparó una serie de tubos de ensayo que contiene las siguientes adiciones a continuación:

50 µl de perlas citométricas BD™ anti-IFNγ y anti TNFα mezcladas en diluyente de ensayo BD

50 µl de reactivo de detección PE

5 Seguido por:

50 µl del sobrenadante de cultivo tomado de los pocillos de ensayo de activación de linfocitos T (muestras de ensayo)

O

10 50 µl de patrones de IFNγ y TNFα preparados en un intervalo de concentraciones por dilución en serie de patrones internos (patrones de calibración)

15 Los tubos fueron incubados en la oscuridad durante 3 horas antes de ser lavados con ml de tampón de lavado BD y se centrifugaron. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 300 µl de tampón de lavado y se determinó el nivel de IFNγ y TNFα por citometría de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 *Inhibición de la línea de linfocitos T policlonal OX84 específica de SLYNTVATL-HLA-A*0201 en presencia de linfocitos T no infectados pulsados con péptido SLYNTVATL*

Se utilizaron los mismos reactivos y métodos que los utilizados para el ensayo anterior de activación de CTL con las siguientes salvedades:

Se utilizaron 2.000 linfocitos T efectores policlonales OX84 en cada ensayo de activación de linfocitos T.

25 Como células diana se utilizaron linfocitos T linfoblastoides no infectados, pulsados con péptido SLYNTVATL 10^{-10} - 10^{-8} M.

30 *Resultados*

El TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble inhibió fuertemente la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-*0201 en presencia de linfocitos T infectados por el VIH, medido por la producción de IFN-γ y de TNF-α. (Ver Figura 19)

35 [El TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble inhibió fuertemente la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-*0201 en presencia de linfocitos T no infectados pulsados con SLYNTVATL, medido por la producción de IFN-γ y de TNF-α. (Ver Figura 20)

40 *Ejemplo 8 - Cuantificación de los antígenos SLYNTVATL-HLA-A*0201 en la superficie celular en linfocitos T2 pulsados con péptido mediante microscopía de fluorescencia utilizando TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad*

45 Se determinó el número de antígenos SLYNTVATL-HLA-A*0201 en células linfoblastoides T2 pulsadas con péptido (en el supuesto de que una señal de fluorescencia se asocia a un único TCR marcado unido a su ligando pMHC afín en la superficie de la célula diana) por microscopía de fluorescencia de molécula única usando un TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble. Esto fue facilitado por el uso de TCR biotinilado para dirigirse a las células cancerosas que expresan el antígeno y el posterior marcado del TCR unido a la célula mediante conjugados de estreptavidina-R-ficoeritrina (PE). Las moléculas de PE individuales fueron visualizadas posteriormente por microscopía de fluorescencia de 3 dimensiones.

50 Las células linfoblastoides T2 se pulsaron con el péptido SLYNTVATL derivado de Gag del VIH, o un péptido irrelevante (SLLMWITQC) en un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) durante 90 minutos a 37 °C. Después de pulsar las células, se lavaron dos veces con 500 µl de PBS. Las células se incubaron en 200 µl de solución de TCR (TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad 100 nM), en PBS (albúmina BSA 0,5 %) durante 30 min a temperatura ambiente. Se extrajo la solución de TCR y las células se lavaron tres veces con 500 µl de PBS. Se incubaron las células en 200 µl de solución de estreptavidina-PE ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ estreptavidina-PE en PBS que contenía BSA 0,5 %) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Se eliminó la solución de estreptavidina-PE y las células se lavaron tres veces con 500 µl de PBS. Se eliminaron los medios de lavado y las células se mantuvieron en 400 µl de R10, sin rojo de fenol antes de la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia.

60 *Microscopio de fluorescencia.* La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo usando un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) con un objetivo de aceite 63x (Zeiss). Se utilizó una fuente de luz Lambda LS que contiene una lámpara de arco de xenón de 300 W (Sutter) para la iluminación, y la intensidad de la luz se redujo a niveles óptimos mediante la colocación de un filtro de densidad neutra de 0,3 y 0,6 en la trayectoria de la luz. Los espectros de excitación y emisión se separaron utilizando un conjunto de filtro TRITC/Dil (Chroma). Se obtuvieron imágenes en

tres dimensiones de las células mediante adquisición en pila z (21 planos, 1 μm de distancia). La adquisición y análisis de imágenes se realizó utilizando el software Metamorph (Universal Imaging) como se ha descrito (Irvine et al., Nature 419: p845-9 y Purbhoo et al., Nature Immunology 5: p524-30).

5 *Resultados*

10 Como se muestra en la Figura 21 se utilizó el método anterior con éxito para obtener una imagen del TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unido antígenos SLYNTVATL-HLA-A*0201 en la superficie de linfocitos T2 pulsados con péptido. Estos resultados muestran que el umbral para el recuento de epítomos sobre las células pulsadas con péptido SLYNTVATL usando el TCR específico de Gag del VIH c11c6 de alta afinidad es de aproximadamente 10^{-9} M de péptido.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende la región variable de la cadena alfa del TCR de la Fig 1a y la región variable de la cadena beta del TCR de la Fig 1b.
2. Un TCR de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la cadena alfa de la Fig 3a y la cadena beta de la Fig 3b.
- 10 3. Un TCR de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la cadena alfa de la Fig 5a y la cadena beta de la Fig 5b.
4. Un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que carece de las regiones transmembrana y citoplásmica.
- 15 5. Una célula que alberga un vector de expresión de TCR que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa del TCR de la Fig 16a y la cadena beta del TCR de la Fig 16b.
- 20 6. Un linfocito T que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Figura 1a

10 20
* *
M A Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D

30 40 50
* * *
R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K

60 70 80
* * *
E D G R F T A Q L N K A S Q Y I S L L I R D S K L S D S A

90 100 110
* * *
T Y L C A V R T N S G Y A L N F G K G T S L L V T P H
(SEQ ID No: 1)

Figura 1b

10 20
* *
M E A G V T Q S P T H L I K T R G Q Q V T L R C S P K S G

30 40 50
* * *
H D T V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y Y E E E E R Q R

60 70 80
* * *
G N F P D R F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S

90 100 110
* * *
A L Y L C A S S D T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T

(SEQ ID NO: 2)

Figura 2a

atggcccagaaggaggtggagcagaattctggacccctcagtggtccagagggagccattgcctctcaattgcacttaca
gtgaccgaggttcccagtccttcttctggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtcatatactccaatgg
tgacaaagaagatggaaggttacagcacagctcaataaagccagccagtatattccctgctcatcagagactccaagctc
agtgattcagccacctacctctgtgcggtgcgcacaaattccgggtatgcactcaactcggcaaaggcacctcgtgttgg
cacaccccatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctctgtctgcctattca
ccgatttgattctcaacaaatgtgtcacaagaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtctagacatgaggtc
tatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta
ttccagaagacaccttcttccccagcccagaaagtctctaa

(SEQ ID No: 3)

Figura 2b

atggaggctggagtcacacaaagtcccacacacctgatcaaacgagaggacagcaagtgactctgagatgctctcttaa
gtctgggcatgacactgtctctggtaccaacaggccctgggtcaggggccccagtttcttctcagttatgaggaggaag
agagacagagaggcaacttccctgatcattctcaggtcaccagttccctaactatagctctgagctgaatgtgaacgccttg
ttgtgggggactcggccctctatctctgtgccagcagcgacaccgtctctacgagcagctactcgggcccgggcaccagg
ctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctccac
acccaaaaggccacactggtgtgcttggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaa
ggaggtgcacagtgagggtcagcacagaccgcagcccccaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctg
agcagccgcctgaggggtctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctc
tcggagaatgacgaglggaccaggatagggccaaaccgacaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagca
gactaa

(SEQ ID No: 4)

Figura 3a

MAQKEVEEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQSF
FWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKA
SQYISLLIRDSKLSDSATYLC AVR TN S GYALNFGK
GTSLLVTPHIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTD
FDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SA
VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS

(SEQ ID No: 5)

Figura 3b

MEAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSW
YQQALGQGPFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQF
PNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSDTVSYEQYFG
PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA
TLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP
LKEQPALNDSRYALS S RLRVSATFWQDPRNHFR C Q
VQFYGLSENDEW T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID No: 6)

Figura 4a

ccatcgatgggcccagaaggaggtggagcagaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaattgc
acttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctgttacagacaataattctgggaaaagccctgagttgataatgttcatatactc
caatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtataatccctgctcatcagagactcc
aagctcagtgattcagccacctactctgtcgggtgcgcacaaattccgggtatgcactcaactcggcaaaggcacctcgc
tgttggtcacacccatataccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagctctgtctgc
ctatcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaatgtgtgctagacat
gaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgatgtgcaaacgccttcaacaac
agcattatccagaagacaccttcttcccagcccagaaagttcctaa
(SEQ ID No: 7)

Figura 4b

tctctcattaatggaggctggagtcacacaaagtcccacacacctgatcaaaacgagaggacagcaagtgactctgagatg
ctctcctaagctctgggcatgacactgtgtcctgtaccaacagccctgggtcaggggccccagtttatcttctcagttatga
ggaggaagagagacagagaggcaacttccctgatcattctcaggtcaccagttccctaactatagctctgagctgaatgtg
aacgccttgttctgggggactcggccctctatctctgtgccagcagcgacaccgtctcctacgagcagctactcgggcccgg
gcaccagg
ctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgtgtgttgagccatcagaagcagagatctcccac
acccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggtttctaccccaccacgtggagctgagctgggtggaatgggaa
ggaggtgcacagtggggtctgcacagaccgcagccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctg
agcagccgctgagggctcggccacctctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtcagttctacgggctc
tcggagaatgacgagtgaccaggatagggccaaaccgtcaccagatcgtcagcggcaggcctggggtagagca
gactaa
(SEQ ID No: 8)

Figura 5a

MAQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRG SQSF
FWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKA
SQYISLLIRDSKLSDSATYLC AVR TN S G Y A L N F G K
G T S L L V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D
F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S

(SEQ ID No: 9)

Figura 5b

MEAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSW
YQQALGQGPFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQF
PNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSDTVSYEQYFG
PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA
TLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQP
LKEQPALNDSRYALS SRLRVSATFWQDPRNHFR C Q
VQFYGLSENDEWTQDRAKPV T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID No: 10)

Figura 6a

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

(SEQ ID NO: 11)

Figura 6b

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

(SEQ ID NO: 12)

Figura 6c

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

(SEQ ID NO: 13)

Figura 7a

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

(SEQ ID NO: 14)

Figura 7b

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

(SEQ ID NO: 15)

Figura 8a

I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T
D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K
(SEQ ID NO: 19)

Figura 8b

E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID NO: 20)

Figura 8c

E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID NO: 21)

Figura 9

PEX954

gatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactataggagaccacaacggttccctctagaataatgtttaaacttaaga
 aggagataataatcgaatgctaaactcagtgacaagtctgtcgcctattcaccgatttgattctcaacaatgtgtcacaagt
 aaggattctgatgtatatacagacaaatgtgtgctagacatgaggctatggactcaagagcaacagtgtgtggcctg
 gagcaacaaatcgaacttgcgatgtgcaaacgcctcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaa
 gttcctaagcttgaattccgatccggctgctaacaagcccgaagggaagctgagttggctgtgccaccgctgagcaataa
 ctagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgagggglltttctgctgaaaggaggaactatccggataattctgaag
 acgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggtaatgcatgataataatggttcttagacgtgagggtgacctttcggg
 gaaatgtgcgcggaaccctatttgtttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgc
 ttcaataatatttgttaaaatcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctat
 aatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggtttccagtttggaaacagagtcactattaaagaacgtggactcaa
 cgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaatcaagtttttggggcagagg
 tgcgtaaaagcactaaatcggaccctaaaggagccccgalltagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcga
 gaaagggaagggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgtaaccacc
 acaccgccgcgcttaatgcgcccgtacagggcgcgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtt
 tatttttcaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagta
 tgaglattcaacattccgtgtcgccttattccctttttcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgtggtgaaa
 gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagttt
 tcccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatgtggcgggtattatcccgtgtgacgccgggca
 agagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagctaccagtcacagaaaagcatcttacggatg
 gcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaactcgggccaacttacttctgacaacgatcgg
 aggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaat
 gaagccataccaaacgacgagcgtgacaccagatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcga
 actacttactctagctccccggcaacaattaatagactggatggagcgggataaagttgcaggaccacttctgcctcggccc
 ttccggctggctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
 ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag

Figura 9 Cont.

ataggtgcctcactgattaagcattggaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgattfaaaacttcattttaatt
aaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacccaaatcccttaacgtgagtttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaccaccgctacc
agcgggtggtttgttggccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaata
ctgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgtt
accagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtctaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcg
gtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt
gagctatgagaaagcggccacgctcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcggaaacagg
agagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttcgccacctgacttgagcgt
cgattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctctggcctttg
ctggccttttctcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgt
cgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcggaggaagcggaaagagcgcctgatgcggtatcttctccta
cgcatctgtcgggtatttcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgctctgatccgcatagtaagccagatacact
ccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtct
gtccccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctcatcaccgaaa
cgcgcgaggcag

(SEQ ID NO: 22)

Figura 10

PEX821

gatctcgcgacccgcgaaattaatacgaactactatagggagaccacaacggfttcctctagaataatgtttaaactttaaga
aggagataacatgaacgctgggtgactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgactgca
gtgtgccaggatatgaacatgaatacatgtcctggtatcgacaagaccaggtcctggggctgaggctgattcattactca
gttggtgctgggtactgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtcctcagatcaaccacagaggattcccgtca
ggctgctgctggctgctccctcccagacatctgtgacttctgtccagcaggccgggactagcgggaggccgaccagag
cagtactcgggcccggcaccaggtcacggcagagggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgtgtgtttga
gccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgctgctggccaccggttctaccccgaccacgtgg
agctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtctgcacagaccgcagcccccaaggagcagccc
ccctcaatgactccagatagctctgagcagccgctgagggctcggccacctctggcaggacccccgcaaccacttcc
gctgtcaagtccagtctacgggctctcgggagaatgacgagtgaccagggatagggccaaaccgacaccagatcgtc
agcggcaggcctgggtagagcagactaagcttgaattccgatccggctgtaacaaaagcccgaagggaagctgagttg
gctgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtctgagggtttttgctgaaaggag
gaactatattccgataattctgaagacgaaaggcctcgtgatacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttct
tagacgtcaggtggcactttcggggaatgtgcgcggaaccctattgtttatcttaatacattcaaatatgatccgctc
atgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgttaaaaatcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaata
ggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagt
ccactatfaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggggcagggccactactgtaaccatca
ccctaatcaagtttttgggctgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaaccctaaagggaagccccgatttagagctgac
ggggaaagccggcgaacgtggcagaaagggaaggggaagaaagcgaaggagcggggcctagggcgtggcaagtg
tagcggctacgctgcgctaacaccacaccgccgcgctaatgccgctacagggcgctcaggtggcacttttcgg
ggaaatgtgcggaaccctattgtttatcttaatacattcaaatatgatccgctcatgagacaataaccctgataaatg
ctcaataatattgaaaaaggaagagatgagtatcaacatttccgtcgccttattccctttttgcggcatttgccttctgt
tttctcaccagaacgctgggtaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggat
ctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgcccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcg
cggattattccggtgacgccgggcaagagcaactcggcgcgcacatactattctcagaatgacttgggtgagactca
ccagtcacagaaaagcattctacggatggcatgacagtaagagaaltatgcagtgctgccataacctgagtgataaactg
cggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactg
ccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccacgatcctgcagcaatggcaa
caacgttgcgcaactatfaactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaa
gttgcaggaccacttctgcctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctc
cggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatg
gatgaacgaaatagacagatcctgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgacagcaagtttactcatata
ctttagattgattfaaacctcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacccaaaatccctaacgt
gagtttctgtccactgagcgtcagaccctgagaaaagatcaaggatcttcttgatcctttttctgcgcgtaactctgctg
cttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgttgggtccggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactg
gctcagcagagcgcagataccaaactgtccttctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtgacaccg
cctacatactcgtctgtaactctgttaccagtggtcgtcggcagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacct
acaccgaactgagatactacagcgtgagctatgagaagcggccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatcc

Figura 10 Cont.

ggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagctccaggggaaacgcctggtaacctatagctctgc
gggttcgccacctctgacttgagcgtcgatfittgtgatgctcgcaggggggaggagcctatggaaaaacgccagcaacg
cggccttttacggctcctggcctttgctggcctttgctcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgggataaccgtatta
ccgcctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgaggaagcgggaag
agcgctgatgcggtattttccttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgctctgatg
ccgatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgc
tgacgcgccctgacgggctgtctgtccccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag
aggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcag
(SEQ ID NO: 23)

Figura 11

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

(SEQ ID NO: 24)

Figura 12

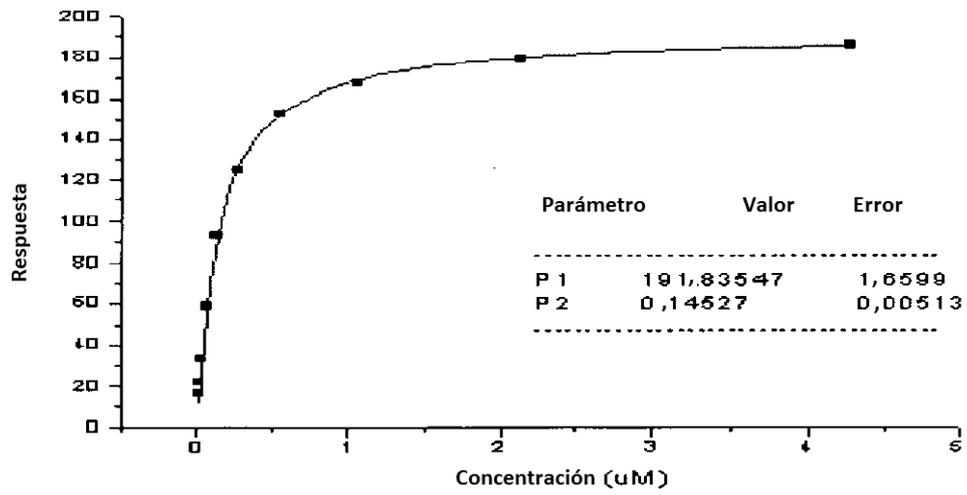
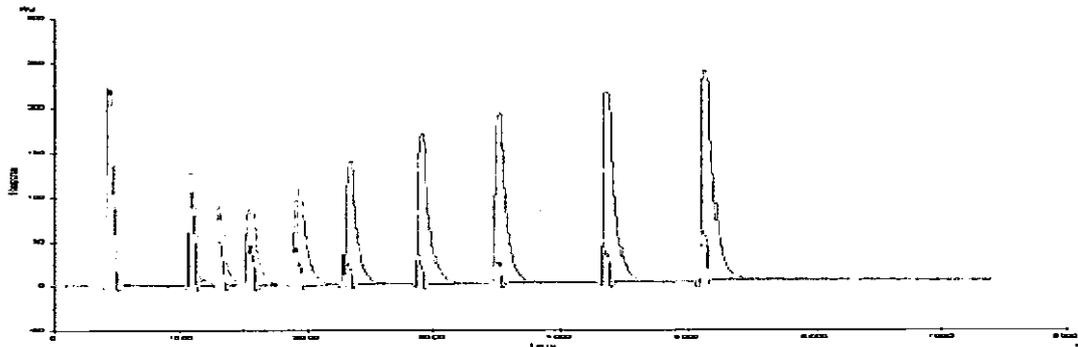


Figura 13

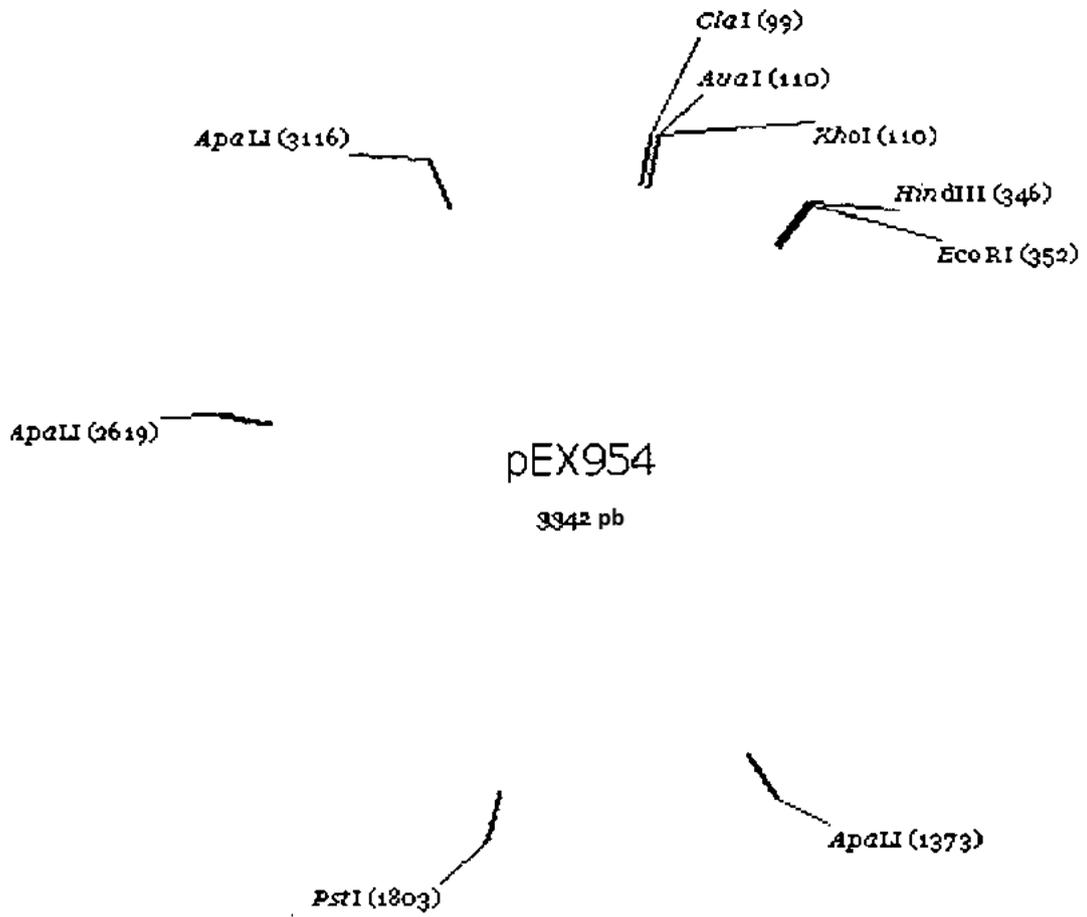


Figura 14

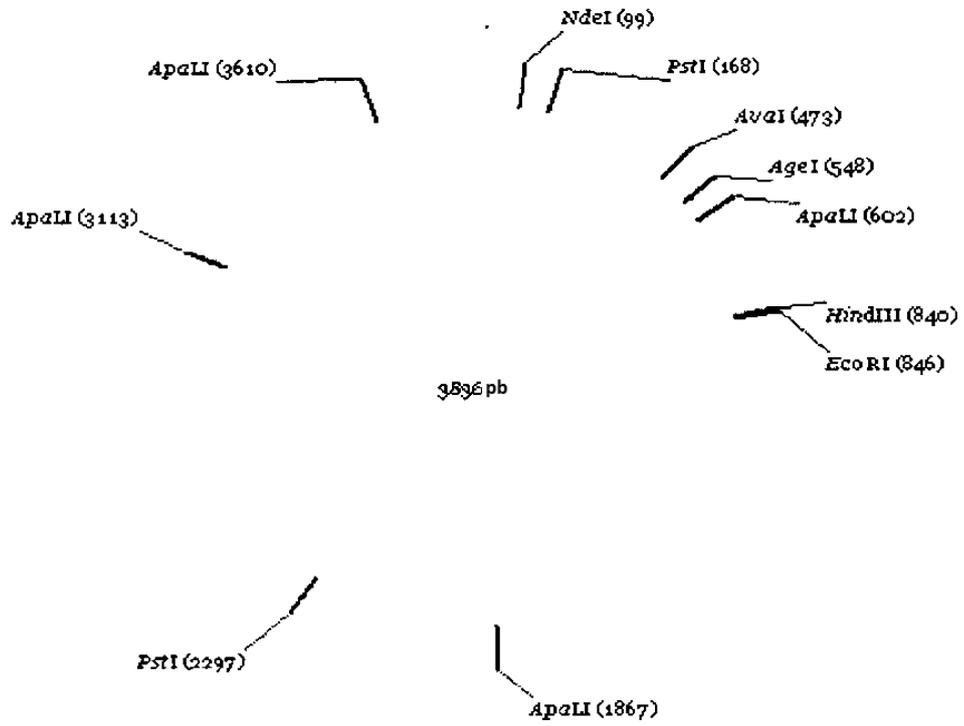


Figura 15a

atgatgaagagcctgaggggtgctgctggtgatcctgtggctgcagctgtcctgggtgtggagccagcag
aaggaggtggagcagaatagcggccctctgagcgtgcccgagggcgccatcgccagcctgaactgtacc
tacagcgacagaggcagccagagcttcttctggtacaggcagtacagcggcaagagccccgagctgatt
atgttcatctacagcaacggcgacaaggaggacggcagattcaccgcccagctgaacaaggccagccag
tacatcagcctgctgatccgggatagcaagctgtccgacagcggccacctacctgtgtgccgtgagaacc
aatagcggctacgcccctgaatttcggcaagggcaccagcctgctgggtgacccccacatccagaatcct
gaccccgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcgcacaagagcgtgtgtctgttcaccgacttc
gacagccagaccaactgtgtccagagcaaggacagcgcagctgtacatcaccgacaagaccgtgctggac
atgaggagcatggacttcaagagcaacagcggcctggcctggagcaacaagagcgcacttcgctgtgcc
aacgcttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagccctgagagcagctgtgacgtg
aaactggtggagaagagcttcgagaccgacaccaacctgaacttcagaacctgagcgtgatccggcttc
agaatcctgctgctgaaggtggccggattcaacctgctgatgacctgagactgtggagcagc
(SEQ ID NO: 25)

Figura 15b

atgggacccggcctgctgtgctgggcccctgctgtgcctgctgggagccggactggtggacgccggagtg
accagagccccaccacctgattaagaccaggggcccagcaggtgacctgagatgtagccctaagagc
ggccacgataaccgtgtcctggtatcagcaggccctgggcccagggaaccagttcatcttccagtactac
gaggaggaggagaggcagagaggcaacttccccgacagattcagcggccaccagttccccaatcagc
agcagctgaacgtgaatgccctgctgctgggcgacagcggccctgtacctgtgtgccagcagcgacaca
gtgagctacgagcagtaacttcggccctggcaccagactgacctgaccgaggacctgaagaactgttcc
cctcctgaggtggccgtgttcgagcccagcagggccgagatcagccacaccagaaaggccacctgggtg
tgtctggccaccgcttctaccccagaccgctggagctgtcctgggtgggtgaacggcaaggaggtgcac
agcggcgtgtccaccgacccccagcccctgaaggagcagcccgcctgaacgatagcaggtactgcctg
agcagcaggctgagagtgagcggccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcag
ttctacggcctgagcagagaacgacgagtggaccccaggatagagccaagcccgtgaccagatcgtgtcc
gccgaggcctggggcagagccgactgtggcttcaccagcagagctaccagcagggcgtgctgtccgcc
accatcctgtacgagatcctgctgggcaaggccacactgtacgcctgctgggtgtccgcccctgggtgctg
atggctatggtgaagcgggaaggacagcagggggc
(SEQ ID NO: 26)

Figura 16a

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

(SEQ ID NO: 27)

Figura 16b

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

(SEQ ID NO: 28)

Figura 17

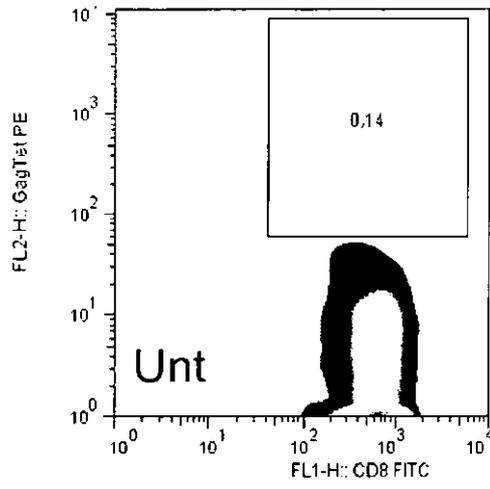


Figura 17a

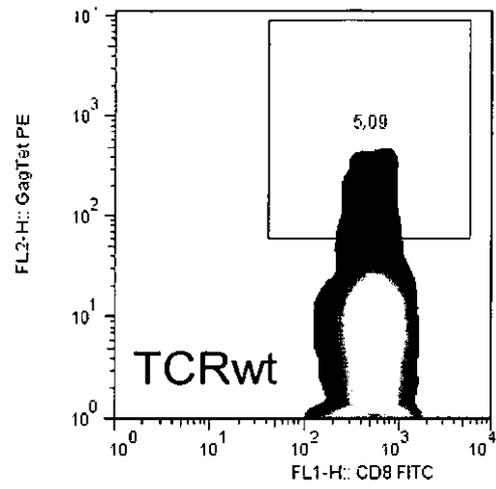


Figura 17b

Figura 18a

MAQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS
QSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFT
AQLNKASQYISLLIRDSKLSDSATYLC AVRGA
HDYALNFGKGTSLLVTPH_IQNPDPAVYQLRDS
KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSSQSKDSDVYITDK
CVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNN
SIIPEDTFFPSPSS

(SEQ ID NO: 29)

Figura 18b

MEAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDT
VSWYQQALGQGPFIFQYALGEERQRGNFPDR
FSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSD
TVSYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFE
PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV
NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSR
LRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQ
DRAKPV TQIVSAEAWGRAD

(SEQ ID NO: 30)

Figura 19

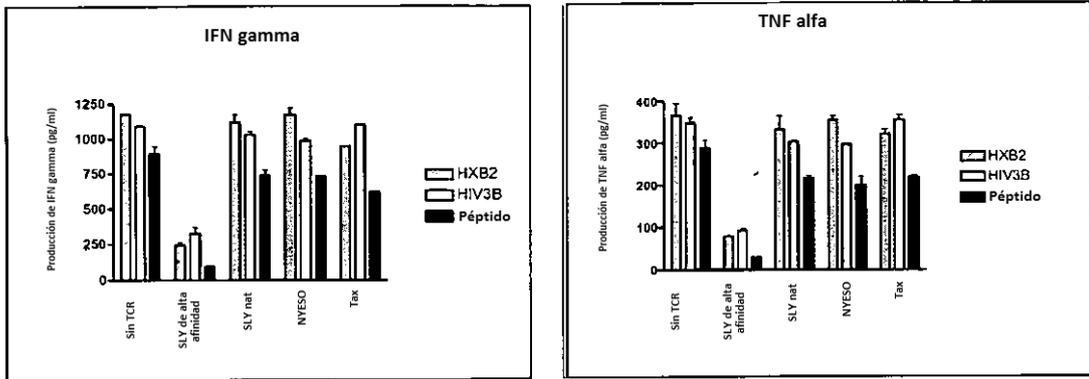


Figura 20

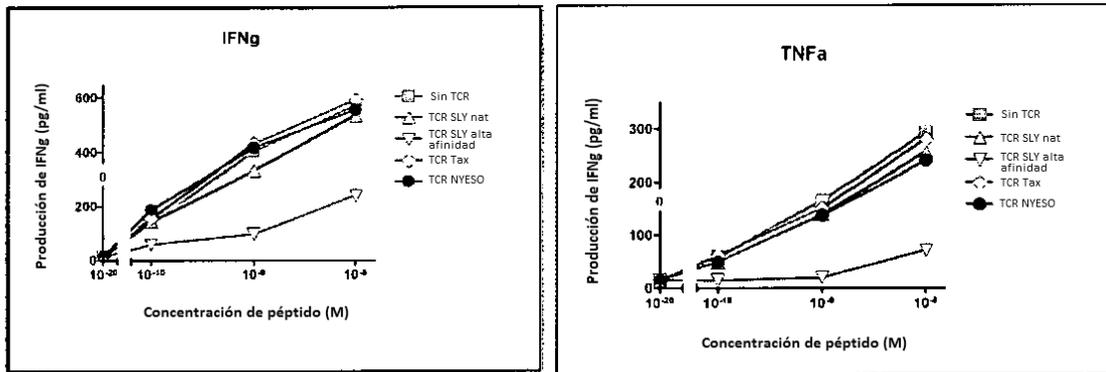


Figura 21

