

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 985**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010 PCT/US2010/028626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10756833 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2411545**

54 Título: **Receptores de linfocitos T específicos de la vpr del VIH**

30 Prioridad:

25.03.2009 US 163421 P

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

21.07.2017

73 Titular/es:

**ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 North Commerce Parkway
Miramar, Florida 33025, US**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ, MARILYN;
LIU, BAI;
MARCUS, WARREN, D. y
WONG, HING, C.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 625 985 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 específicos de la vpr del VIH

Antecedentes de la invención

5 Las estrategias actuales para tratar la infección por VIH están principalmente dirigidas a limitar la replicación o la infectividad vírica, pero no se dirigen al virus latente o a las células infectadas por el virus. Como resultado de la alta tasa de mutación del VIH, las variantes resistentes a fármacos emergen a partir del reservorio del virus latente, dando lugar a una progresión de la enfermedad en pacientes tratados y a la infección de otros individuos. Varios estudios han demostrado que el escape vírico de las respuestas de los CTL se da comúnmente durante el ciclo de la infección. Las variantes de escape pueden surgir a través de la selección de variaciones de secuencia en posiciones 10 que son importantes para la unión al MHC o en posiciones que son responsables de la interacción entre el TCR y el complejo péptido-MHC. Es importante evitar estas mutaciones de escape de los CTL víricos para provocar una respuesta eficaz de los CTL y para el desarrollo de vacunas contra el VIH-1.

Por consiguiente, existe la necesidad de agentes terapéuticos que puedan dirigirse de forma efectiva no solo al tipo general del VIH, sino también a variantes que se desarrollan durante el ciclo de la infección.

15 El documento WO 2006/103429 desvela un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse al SLYNTVATL-HLA-A*0201 y que 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 caracterizado porque dicho TCR tiene un valor K_d para dicho complejo SLYNTVATL-HLA-A*0201 menor o igual que $1 \mu\text{M}$ 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, siempre que cuando dicho TCR se presente por el linfocito y 20 comprenda las SEQ ID NO: 1 y 2, el linfocito no sea un linfocito T nativo.

El documento US 2008/015139 desvela composiciones y procedimientos para diagnosticar una infección vírica y procedimientos para inhibir tal infección. Los procedimientos se basan en la identificación de secuencias génicas del receptor de linfocitos T a partir de clones de linfocitos T citotóxicos que son específicos para el VIH-1 o el VHC. Se identificaron y construyeron composiciones de receptores de linfocitos T solubles que se unían a patógenos del VIH 25 y del VHC restringidos a HLA (*antígenos leucocitarios humanos*) de clase I.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto moléculas de TCR que se unen a péptidos derivados de la proteína vpr del VIH cuando se presentan en su complejo MHC afín. Específicamente, los presentes inventores han creado mutaciones en estos TCR que permiten que las moléculas de TCR resultantes se unan a variantes del epítipo del péptido de la vpr, al mismo tiempo que se unen al epítipo del péptido consenso de la vpr. Los inventores han creado 30 TCR mutantes que se unen al epítipo AL9 consenso de la vpr (AIIIRILQQQL, aminoácidos 59-67) con afinidad de unión mejorada, al mismo tiempo que también se unen a variantes comunes de este epítipo.

Por consiguiente, la invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) aislado que se une específicamente a un epítipo del VIH que tiene la secuencia de peptídica AIIIRILQQQL de la vpr del VIH-1, en el que el TCR 35 comprende la secuencia V alfa del TCR representada en la Figura 1B o 1C o una secuencia del TCR de tipo silvestre representada en la Figura 1A con una mutación S39P. En una realización, la mutación aumenta la productividad, la estabilidad, la actividad de unión específica, o la actividad funcional del TCR. En otra realización, la mutación reduce la unión no específica del TCR mutante en comparación con la del TCR de tipo silvestre. En realizaciones específicas, el TCR es un TCR de cadena simple o un TCR heterodimérico. En una realización, el TCR comprende 40 más de un dominio de unión al TCR.

Los TCR de la invención reconocen al péptido AL9 (AIIIRILQQQL) de la vpr. En otra realización, el péptido AL9 se presenta en el contexto de las HLA-A2.

La mutación en el resto de aminoácido 39 en la cadena $V\alpha$ es de Ser por Pro y/o la mutación en el resto de aminoácido 93 en la cadena $V\alpha$ es de Tyr por His, Leu, Lys, Gln, o Ala.

45 En otra realización, los TCR de la invención se unen de forma específica a una o más variantes peptídicas de AL9 de la vpr del VIH-1 tal como se describe anteriormente. En una realización, los TCR de la invención se unen a las variantes peptídicas de AL9 en el contexto del HLA-A2. En una realización relacionada, las variantes peptídicas de AL9 comprenden uno o más cambios de aminoácido en la secuencia peptídica AL9.

En otra realización, los TCR de la invención tienen mayor estabilidad a temperaturas elevadas en comparación con la del TCR de tipo silvestre. En realizaciones preferidas de la invención, los TCR son solubles.

50 En otra realización, el TCR comprende adicionalmente un dominio polipeptídico funcional, un agente de diagnóstico/formación de imágenes, una nanopartícula que contiene fármaco, un agente terapéutico, un agente citotóxico o un agente antivírico. En realizaciones ejemplares, el dominio polipeptídico funcional comprende una citocina, un dominio de inmunoglobulina, un dominio receptor o una secuencia de etiqueta polipeptídica. En otra

realización ejemplar, la citocina comprende IL-2, IL-15, GM-CSF, interferón, el dominio de la inmunoglobulina comprende las regiones constantes de la IgG 1 o los dominios Fc de la Ig, o un fragmento de los mismos. En otra realización ejemplar, la etiqueta polipeptídica comprende la secuencia birA.

5 En otra realización, el TCR comprende adicionalmente un dominio transmembrana que permite la expresión del TCR en la superficie celular. En una realización, el TCR comprende adicionalmente un dominio citoplasmático, en el que el dominio citoplasmático permite la señalización celular en respuesta a las interacciones entre el TCR mutante y el epítipo del VIH. En una realización, el TCR comprende dominios de señalización transmembrana y/o citoplasmática de las proteínas CD3, CD28, CD8, 4-1BB, Ox-40, ICOS y/o Lck. Como alternativa, el TCR puede comprender dominios de señalización transmembrana del TCR y/o citoplasmática del TCR. Anteriormente, se han desvelado
10 varias proteínas de fusión solubles y unidas a la membrana (Card y col. 2004 *Cancer Immunol Immunother.* 53:345; Mosquera y col. 2005 *J. Immunol.* 174:4781; Zhu X y col. 2006 *J. Immunol.* 176:3223; Belmont y col. 2006 *Clin. Immunol.* 121:29; Finney y col. 2004 *J. Immunol.* 172: 104; Brentjens y col. 2007 *Clin Cancer Res.* 13, 5426; Zhang y col. 2004 *Cancer Gene Therapy* 11.487).

15 En otra realización, la mutación aumenta además la actividad del TCR para detectar células que presentan un epítipo del VIH en comparación con la del TCR de tipo silvestre. En otra realización, la mutación aumenta la actividad funcional citotóxica del TCR frente a células que presentan un epítipo del VIH en comparación con la del TCR de tipo silvestre.

20 En otra realización, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los TCR de la invención, por ejemplo, tales como los que se presentan en la Figura 2. En una realización, la invención proporciona vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención. En otra realización relacionada más, la invención proporciona células hospedadoras que comprenden el vector de expresión de la invención. En una realización, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero, por ejemplo, una célula humana.

25 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos *in vitro* para detectar células infectadas con el VIH poniendo en contacto una célula con el TCR de la invención y determinando si el TCR se une a la célula, en el que la unión del TCR con la célula es indicativa de infección por VIH.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos *in vitro* para eliminar una célula infectada por VIH poniendo en contacto la célula con el TCR de la invención, eliminando de ese modo la célula infectada con VIH.

30 Adicionalmente se describen procedimientos para determinar si un sujeto está infectado por VIH obteniendo una muestra biológica de un individuo y poniendo en contacto la muestra biológica con un TCR de la invención, en el que la unión del TCR con la muestra biológica es indicativa de que el sujeto está infectado con VIH.

Adicionalmente se describen procedimientos para tratar a un sujeto que tiene VIH, administrando al individuo un TCR de la invención o un ácido nucleico, un vector de la invención o una célula hospedadora de la invención, tratando de ese modo al sujeto.

35 Adicionalmente se describen procedimientos para inhibir la infección por VIH en un sujeto, administrando al individuo un TCR de la invención, el ácido nucleico o el vector de la invención o la célula hospedadora de la invención, inhibiendo de ese modo la infección por VIH en un sujeto.

Adicionalmente se describen los procedimientos que además comprenden la identificación de un sujeto con un riesgo de infección por VIH aumentado.

40 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un TCR de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona kits que comprenden un TCR de la invención e instrucciones para su uso.

Descripción de las figuras

La figura 1A representa la secuencia de la proteína AL9scTCR de tipo silvestre (las CDR en cursiva).
La figura 1B representa la secuencia de la proteína AL9scTCR con mutación única (Y93H).
45 La figura 1C representa la secuencia de la proteína AL9scTCR con doble mutación (S39P, Y93H).
La figura 2A representa la secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR de tipo silvestre (las CDR en cursiva).
La figura 2B representa la secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR con mutación única.
La figura 2C representa la secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR con doble mutación.
La figura 3A representa las secuencias líder ejemplares.
50 La figura 5 es una caracterización de las mutaciones Y93 y A97CDR3 en V α de la AL9scTCR producida en las células HEK-293. La figura 6 es una caracterización de la Y93 AL9scTCR sm producida en las células CHO.
La figura 7 es una caracterización de la S39P AL9scTCR producida en las células CHO.
La figura 8 es una caracterización de las AL9scTCR sm y dm producidas en las células CHO.
La figura 9 es una caracterización de las proteínas AL9scTCR sm y dm purificadas.
55 La figura 10A ilustra una titulación de las proteínas AL9scTCR wt y sm en células T2 cargadas con AL9 mediante

citometría de flujo.

La figura 10B ilustra la unión de los multímeros AL9scTCR wt, sm y dm con células T2 cargadas con el péptido AL9 o p53 (control).

La figura 10C ilustra la unión de los multímeros AL9scTCR wt, sm y dm con células T2 o linfocitos B cargados con el péptido AL9 o p53 (control).

La figura 10D ilustra la ausencia de unión de los multímeros AL9scTCR wt y sm con los péptidos no específicos cargados en células T2.

La figura 11 ilustra el análisis de la unión competitiva mediante citometría de flujo.

La figura 12 ilustra la unión de los monómeros AL9scTCR wt y sm con células T2 cargadas con diferentes cantidades de péptido AL9.

La figura 13 ilustra la unión de los multímeros AL9scTCR wt y sm con células T2 cargadas con mutantes del péptido AL9.

La figura 14A ilustra el análisis publicado de las variantes del péptido AL9 de la vpr que se dan con más frecuencia (Altfeld y col. 2005. J. Virol. 79: 5000).

La figura 14B ilustra el análisis de citometría de flujo de la unión de las fusiones AL9scTCR wt, sm y dm con las variantes del péptido AL9 en comparación con el AL9 consenso.

La figura 14C ilustra la titulación del péptido AL9 I63M.

La figura 14D ilustra un resumen de la unión relativa de las fusiones AL9scTCR wt y sm con las variantes del péptido AL9 en comparación con el AL9 consenso.

La figura 15 ilustra la unión de los multímeros AL9scTCR wt y sm con el péptido AL9 presentado mediante linfocitos T CD4 humanos infectados por VIH.

La figura 16A ilustra la unión de la proteína de fusión DM AL9scTCR-Ig con el AL9 y con variantes del AL9.

La figura 16B ilustra la unión de la proteína de fusión DM AL9scTCR-Ig con la variante AL9 I63M.

La figura 15 ilustra la unión de los multímeros AL9scTCR wt y sm con el péptido AL9 presentado mediante linfocitos T CD4 humanos infectados por VIH.

La figura 16A ilustra la unión de la proteína de fusión DM AL9scTCR-Ig con el AL9 y con variantes del AL9.

La figura 16B ilustra la unión de la proteína de fusión DM AL9scTCR-Ig con la variante AL9 I63M.

La figura 16C ilustra la unión de las proteínas de fusión WT, SM y DM AL9scTCR-Ig con el AL9 y con variantes del AL9.

La figura 17A ilustra la mediación de la actividad citolítica de la proteína de fusión DM AL9scTCR-Ig contra células T2 cargadas con AL9.

La figura 17B ilustra la mediación de la actividad citolítica de las proteínas de fusión DM y SM AL9scTCR-Ig contra células T2 cargadas con AL9.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han descubierto moléculas de TCR que se unen a péptidos derivados de la proteína vpr del VIH cuando se presentan en su complejo MHC afín. Específicamente, los presentes inventores han identificado los TCR que se unen al epítipo AL9 de la vpr (AIIRILQQQL, aminoácidos 59-67). Además, los inventores han identificado variantes de esos TCR que reconocen diversas variantes comunes que surgen en el epítipo AL9 durante el ciclo de infección por el virus. Los datos desvelados en el presente documento aclaran secuencias de los TCR específicas del VIH-1 para el uso diagnóstico y terapéutico.

La presente invención se refiere a un receptor de linfocitos T (TCR) aislado que se une específicamente a un epítipo del VIH que tiene la secuencia peptídica AIIRILQQQL de la vpr del VIH-1, en el que el TCR comprende la secuencia Valfa del TCR representada en la Figura 1B o 1C o una secuencia del TCR de tipo silvestre representada en la Figura 1A con una mutación S39P.

Actualmente, se dispone de anticuerpos recombinantes específicos del VIH-1 que actúan directamente sobre células infectadas por el VIH-1. Un inconveniente de la estrategia con anticuerpos es que solo los anticuerpos del VIH-1 pueden acceder a la envoltura del virus VIH-1, mientras que las proteínas funcionalmente más importantes del VIH se ocultan dentro de la célula infectada y solo son accesibles al sistema inmunitario después de un procesamiento intracelular y presentación por moléculas del MHC de clase I o II. Una vez presentados por moléculas del MHC, los TCR, y no los anticuerpos, reconocen estos productos génicos del VIH. Por lo tanto, los anticuerpos del VIH-1 solo permiten un direccionamiento muy limitado de células infectadas por VIH-1. Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan una solución a este problema.

Los TCR solubles que son específicos para el VIH1, tienen ventajas significativas sobre las estrategias existentes.

Las secuencias del TCR son útiles para la producción del TCR de cadena simple recombinante que son capaces de reconocer de forma específica las células infectadas por VIH-1. Estos TCR recombinantes se usan prácticamente para (i) el direccionamiento *in vivo* en células infectadas por VIH-1 en estrategias inmunoterapéuticas, transferencia de genes de compuestos terapéuticos basados en células, (ii) la evaluación *ex vivo* de la expresión del antígeno del VIH-1 en linfocitos o en células presentadoras de antígeno profesionales. El análisis cuantitativo de la expresión del antígeno del VIH-1 es importante en estudios sobre inmunopatogénesis del VIH-1 y son útiles para la exploración/control de estrategias preventivas y terapéuticas.

Actualmente, el tratamiento de pacientes infectados por VIH-1 se basa en el uso de fármacos antirretrovíricos. Estos fármacos son muy eficaces, pero tienen toxicidad acumulativa, se asocian con altas cargas de píldora y pueden conducir a resistencia vírica. Por lo tanto, existe una continua necesidad de otras opciones de tratamiento para estos pacientes. Las estrategias de tratamiento inmunoterapéutico con TCR solubles representan una opción de tratamiento alternativa para la población de pacientes infectados por el VIH-1. Además, el TCR se usa para la evaluación *ex vivo* de la expresión del antígeno del VIH-1.

Los TCR descritos en el presente documento reconocen diversas variantes del gen *vpr* que normalmente surgen durante la infección por VIH, permitiendo aumentar la eficacia de las moléculas de la invención en comparación con los TCR previamente identificados.

La invención presenta procedimientos *in vitro* y composiciones para el diagnóstico y el tratamiento de infecciones víricas. Los procedimientos se basan en la identificación de receptores de linfocitos T que son específicos para el VIH-1. Específicamente, la presente invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) aislado que se une específicamente a un epítipo del VIH que tiene la secuencia de peptídica AIIIRILQQQL de la *vpr* del VIH-1, en el que el TCR comprende la secuencia V α del TCR representada en la Figura 1B o 1C o una secuencia del TCR de tipo silvestre representada en la Figura 1A con una mutación S39P. Las mutaciones en la cadena V α del TCR permiten el reconocimiento de variantes de secuencias de *vpr*.

Procedimientos de diagnóstico

Los TCR solubles se utilizan para analizar la presentación, mediada por HLA, de epítopos de linfocitos T citotóxicos en células presentadoras de antígeno profesionales o en células infectadas por VIH. Por ejemplo, una muestra de fluido corporal, por ejemplo, sangre, o tejido corporal, por ejemplo, nódulo linfático, se obtiene de un sujeto. Los leucocitos de la muestra se ponen en contacto con los TCR de cadena simple descritos en el presente documento. Para aumentar la sensibilidad, construcciones de cuatro TCR de cadena simple se unen entre sí, por ejemplo, con una estreptavidina central para formar un complejo tetramérico. La construcción se une a un marcador detectable, por ejemplo, marcado con un fluoróforo fluorescente. Los marcadores detectables incluyen fluorocromos tales como ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), y alofocianina (APC). La detección se lleva a cabo mediante citometría de flujo y/o tinción de tejidos (microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica). En otro ejemplo, una pluralidad de construcciones de TCR se inmoviliza en una micromatriz, por ejemplo, una microplaca o placa, y se permite que una muestra procedente del paciente se ponga en contacto con la matriz, la matriz se lava, y se detectan las células unidas. De este modo, se determina el péptido expresado o presentado en la célula presentadora de antígeno o en la célula infectada por VIH de un paciente. Por lo tanto, los TCR solubles también son útiles como herramienta de investigación para la evaluación *ex vivo* y la cuantificación de la presentación del epítipo del VIH-1. Son herramientas útiles para identificar pacientes que expresan epítopos del VIH-1 específicos, por ejemplo, el epítipo AL9 de *vpr*, y son por lo tanto, candidatos prometedores para las intervenciones inmunoterapéuticas descritas en el presente documento.

Procedimientos de terapia

Para tratar pacientes infectados con VIH, se administra una o una mezcla de construcciones de TCR de cadena simple solubles. En una realización, los TCR de la invención inducen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). La ADCC proporciona una respuesta inmunitaria eficaz contra la infección por VIH. Se ha asociado con protección frente a enfermedades del virus de la inmunodeficiencia de simios en macacos, el retraso de la infección progresiva por VIH en humanos, la protección de usuarios con fármacos intravenosos frente a la infección por VIH-1, y con cargas víricas genitales de VIH más bajas. La capacidad de, por ejemplo, la AL9 scTCR Ig de alta afinidad para mediar una actividad similar a la ADCC demuestra que podrían usarse en un TCR, también son útiles como herramienta de investigación para la evaluación *ex vivo* y la cuantificación de la presentación del epítipo del VIH-1. Son herramientas útiles para identificar pacientes que expresan el epítipo AL9 de la *vpr*, y son por lo tanto, candidatos prometedores para las intervenciones inmunoterapéuticas descritas en el presente documento.

Procedimientos de terapia

Para tratar pacientes infectados con VIH, se administra una o una mezcla de construcciones de TCR de cadena simple solubles. En una realización, los TCR de la invención inducen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC proporciona una respuesta inmunitaria eficaz contra la infección por VIH. Se ha asociado con protección frente a enfermedades del virus de la inmunodeficiencia de simios en macacos, el retraso de la infección progresiva por VIH en humanos, la protección de usuarios con fármacos intravenosos frente a la infección por VIH-1, y con cargas víricas genitales de VIH más bajas. La capacidad de, por ejemplo, la AL9 scTCR Ig de alta afinidad para mediar una actividad similar a la ADCC demuestra que podrían usarse en una estrategia de inmunoterapia pasiva para estimular respuestas inmunitarias innatas, fuertes y dirigidas contra células infectadas por VIH.

En una realización alternativa, los TCR además comprenden una segunda composición tal como un dominio polipeptídico funcional, un agente de diagnóstico/formación de imágenes, una nanopartícula que contiene fármaco, un agente terapéutico, un agente citotóxico o un agente antivírico. En realizaciones ejemplares, el dominio

polipeptídico funcional comprende una citocina, un dominio de inmunoglobulina, un dominio receptor o una secuencia de etiqueta polipeptídica. Las citocinas ejemplares son IL-2, IL-15, GM-CSF, o interferón, y el dominio de inmunoglobulina ejemplar comprende regiones constantes de la IgG1 o dominios Fc de la Ig, o un fragmento de los mismos.

- 5 Una ventaja de tal construcción es el aumento de la semivida y el suministro específico de antígenos de estos reactivos directamente a las células infectadas. Esta estrategia terapéutica reduce la dosis general de fármaco, la frecuencia de la dosis, y los efectos secundarios asociados al tratamiento.

En una realización alternativa, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la invención o la célula que expresa los TCR de la invención se pueden usar en estrategias basadas en transferencia de genes *in vitro* o basadas en células, para eliminar las células infectadas por VIH o para prevenir o tratar la infección por VIH. En un ejemplo, los genes que codifican los TCR de la invención se pueden transferir *in vitro* en células inmunitarias, de tal manera que las células inmunitarias expresarán ahora los TCR de la invención en la superficie celular. Estas células podrían activarse después para expresar funciones inmunitarias cuando el TCR interacciona con el péptido vpr del VIH presentado en el complejo HLA-A2. Estas células podrían usarse en la eliminación de células infectadas por VIH *ex vivo* o son para su uso, después de su infusión en pacientes con infección por VIH, para eliminar células infectadas por VIH en el paciente. Como alternativa, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la invención se usan administrándose directamente a los pacientes, permitiendo, de este modo, la transferencia de genes en las células inmunitarias del paciente y la expresión de los TCR de la invención en estas células *in vivo*. Tales células podrían proporcionar actividad protectora o terapéutica frente a la infección por VIH.

20 Los TCR de la invención se pueden suministrar mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, para suministrar los TCR, puede usarse administración parenteral, tal como la vía de suministro intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Por ejemplo, la fusión de TCR soluble se ha inyectado por vía intravenosa en ratones y en seres humanos a una dosis de 0,015 a 10 mg/kg. La determinación de las dosis del paciente se lleva a cabo usando procedimientos bien conocidos en la materia.

25 Las composiciones de la invención son para su uso para administrarse para prevenir o tratar la infección por VIH o reducir el número de células infectadas por VIH. La determinación de la dosificación y del régimen de administración adecuados para una situación en particular está dentro de la experiencia de la materia. Una cantidad eficaz de una proteína terapéutica es preferente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg. Las dosis eficaces varían, tal como reconocen los expertos en la materia, en función de la naturaleza del tratamiento terapéutico (es decir, biológico, basado en ácido nucleico o en células), la vía de administración, el uso de excipientes, y la coadministración con otros tratamientos terapéuticos que incluyen el uso de otros agentes o de agentes terapéuticos. Un régimen terapéutico se lleva a cabo identificando a un mamífero, por ejemplo, un paciente humano que padece (o está en riesgo de desarrollar) una infección por un patógeno vírico, usando procedimientos estándar. El compuesto farmacéutico se administra a tal individuo usando procedimientos conocidos en la materia.

35 Preferentemente, el compuesto se administra por vía oral, por vía rectal, por vía nasal, por vía tópica o por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular, y por vía intravenosa.

Ejemplo 1: Generación de construcciones de TCR de cadena simple con mutaciones específicas

Los CTL de la Vpr de la HLA-A2, una proteína accesoria de 14 kD del VIH, juegan un papel crucial en la replicación vírica y en la supresión de la respuesta inmunitaria del hospedador. Es una de las proteínas a las que se dirigen más frecuentemente los CTL en relación con la longitud de la proteína. Se han encontrado respuestas de linfocitos T CD8+ contra la Vpr en el 45 % de los individuos (Altfeld y col. 2001, J. Immunol. 167: 2743). El epítipo AIIRILQQL (aminoácidos 59-67) (epítipo AL9) de la Vpr restringido por el HLA-A2.1 puede representar una buena diana temprana para los linfocitos T CD8+, en la infección primaria en un subconjunto de individuos positivos a HLA-A2. Es la secuencia actual más habitual en este epítipo (secuencia consenso) y se dirige con frecuencia similar en individuos con infecciones agudas (21 %) y crónicas (24 %) (Altfeld y col. 2005, J. Virol. 79: 5000). Las terapias dirigidas contra las células que expresan vpr podrían ser posiblemente útiles en la eliminación de células infectadas por VIH. Sin embargo, Altfeld y col. también demostraron que los individuos infectados en la fase aguda de la infección por virus que contienen la secuencia consenso, no pueden generar respuestas de linfocitos T específicas del epítipo, aunque todos los sujetos infectados por la variante I60L desarrollaron estas respuestas. Las variantes del epítipo de AL9 pueden surgir con frecuencia y se necesita dirigirse a ellas con terapias diseñadas para eliminar el virus.

Los receptores solubles de linfocitos T podían usarse para suministrar moléculas terapéuticas de forma efectiva a las células infectadas. La baja afinidad intrínseca (1-100 μ M) de los TCR por el péptido-MHC afin ha sido la principal limitación para las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Los contactos entre el TCR y el péptido-MHC se producen a través de la V α de la CDR1, CDR2 y CDR3 y/o la V β de la CDR1, CDR2 y CDR3, estableciendo los dominios CDR3 los mayores contactos con el péptido. Diversos estudios han demostrado que la mutación de restos en estas regiones puede mejorar la afinidad del TCR. Las variantes de alta afinidad del 2C TCR, un TCR alorreactivo de ratón, se identificaron mediante presentación en levaduras después de la selección de una biblioteca de CDR3 α mutantes. También se ha usado, para mejorar la afinidad del TCR, la mutación de las regiones CDR3 de los TCR

específicos para el antígeno asociado a tumor NY-ESO-1 y el péptido de tax del virus linfotrópico de linfocitos T humanos de tipo 1 (HTLV-1) y su presentación en la superficie de fagos.

Los ejemplos describen la generación y caracterización de un TCR de cadena simple que reconoce los aminoácidos 59-67 de la proteína vpr (epítipo AL9) en contexto con HLA-A2. El TCR nativo se une al péptido consenso AL9 con un valor K_d de 1,8 μ M, que está en el intervalo de alta afinidad de la mayoría de los TCR. Sin embargo, no reconoce algunas variantes que se sabe que surgen durante el ciclo de la infección, con buena afinidad. Para superar esta limitación, y además aumentar su afinidad, se creó una versión mutante de la proteína mediante la sustitución de tirosina (Y) por histidina (H) en la región bucle de CDR3 α . El mutante se une con mucha mayor afinidad a la secuencia consenso AIIRILQQL, mientras conserva un alto grado de la especificidad del péptido. De manera importante, las variantes de epítipo de las que se sabe que surgen frecuentemente durante la infección por VIH, se pueden reconocer mediante el nuevo TCR mejorado con mucha mayor afinidad que el TCR de tipo silvestre. Asimismo, una forma multimérica del TCR de alta afinidad puede unirse de forma eficaz a linfocitos T CD4+ infectados por VIH-1. La AL9scTCR de tipo silvestre y los mutantes de alta afinidad se fusionaron al dominio constante de la cadena pesada de la Ig para otorgarle una función efectora. Esta proteína de fusión mantiene la actividad de unión específica del péptido, forma dímeros y puede mediar la eliminación de células diana mediante citotoxicidad celular dependiente de Fc.

Los CTL específicos para el péptido AL9 (aminoácidos 59-67: AIIRILQQL)/complejos HLA-A2 se aislaron de un paciente infectado por VIH-1, tal como se describe anteriormente (Altfeld y col. 2005. J. Virol. 79: 5000) y sirven como fuente para generar los ADNc del TCR α y β . Las regiones V de las cadenas α y β del TCR que se dan con más frecuencia obtenidas de estos CTL fueron TRAV5/TRAVJ36 y TRBV14/TRBJ2-1, respectivamente, tal como se describe anteriormente (en el documento USSN 11/784.277).

Para generar TCR de alta afinidad, se pueden mutar las regiones CDR del TCR y los restos de aminoácidos adyacentes y explorar las proteínas resultantes. Para el TCR específico de HLA-A2/AL9 (TCR de AL9), en la Figura 1A se muestran las secuencias CDR de la V α y V β , mostrándose los correspondientes ácidos nucleicos que codifican las regiones en la Figura 2A. Para este ejemplo, las regiones CD3 de la V α se mutaron usando una estrategia de mutagénesis en la que cada uno de los aminoácidos en la región CD3 de la V α se reemplazó de manera sistemática por uno de nueve aminoácidos, elegidos para representar las principales químicas de la cadena lateral proporcionadas por los 20 aminoácidos naturales. Estudios previos han demostrado que es posible generar TCR de alta afinidad mutando los aminoácidos en el bucle de CDR3 α (Holler y col. 2000 PNAS 10: 5387), que se encuentra en el centro de la interfaz péptido-MHC. Por lo tanto, la secuencia de genes de los 5 aminoácidos (Y-Q-T-G-A) que codifica el AL9 del TCR en el bucle de la V α de la CDR3 se mutaron para los 9 aminoácidos representativos de las principales químicas de la cadena lateral. Estos aminoácidos se localizaron entre los aminoácidos 93-97 de la cadena V α del TCR, con cambios en la posición 93 (tyr) que muestran una mejorada (mayor) afinidad por el complejo HLA-A2/AL9.

En el segmento de genes de la V α aislados, se descubrió un codón de serina no consenso en la posición del aminoácido 39 en la segunda región marco conservada. Este codón se mutó a un codón de prolina consenso para evaluar los efectos de este cambio sobre la productividad, estabilidad y afinidad del TCR.

Para introducir secuencias que codificasen diferentes mutaciones en el gen de la V α , la secuencia CDR3 α se modificó mediante mutagénesis dirigida para que contuviese un único sitio de enzima de restricción (Agel). Este cambio no dio como resultado ningún cambio en los aminoácidos codificados. Los fragmentos génicos del gen mutado V α del TCR se generaron después mediante procedimientos de PCR estándar usando cebadores de oligonucleótidos que codifican los cambios deseados en la secuencia. Estos fragmentos génicos se clonaron en el gen V α , sustituyendo a la secuencia de tipo silvestre. Las cadenas α y β del TCR se clonaron en el formato TCR de cadena simple (sc, *single chain*) compuesto de un dominio V α unido a los dominios V β /C β mediante un enlazador flexible (Card y col. 2004 Cancer Immunol Immunother. 53:345; Mosquera y col. 2005 J. Immunol. 174:4781; Zhu X y col. 2006 J. Immunol. 176:3223). El dominio C β se truncó justo antes de la cisteína final.

Para crear la fusión TCRsc-birA, el segmento del gen del TCRsc se clonó cadena arriba de la secuencia que codifica la secuencia de etiqueta birA. La etiqueta birA permite la biotilación específica de sitio de la proteína para una multimerización posterior usando estreptavidina. Para generar la fusión TCRsc IgG 1, el segmento del gen del TCRsc se clonó cadena arriba de la secuencia que codifica la región de la cadena constante de la IgG 1 humana. De manera similar, las fusiones TCRsc-IL2, TCRsc-INF α , TCRsc-GMCSF, TCRsc-IL15 y TCRsc-IL15R se generaron enlazando los segmentos del gen del TCRsc con las secuencias génicas de la citocina o del receptor de la citocina. Para la expresión en la membrana, el gen del TCRsc se clonó cadena arriba de la secuencia que codifica el dominio transmembrana de HLA A2 o el dominio transmembrana de CDR3zeta. Para la expresión en la membrana y para la señalización celular, los segmentos del gen del TCRsc se pueden enlazar a secuencias que codifican los dominios CD3zeta, CD28, CD8, 4-1BB, Ox-40, ICOS y/o Lck. Como alternativa, el TCR se puede expresar en la superficie celular como un TCR α/β heterodimérico que contiene dominios de señalización transmembrana y citoplasmáticos del TCR. Anteriormente, se han desvelado varias proteínas de fusión solubles y unidas a la membrana (Card y col. 2004 Cancer Immunol Immunother. 53:345; Mosquera y col. 2005 J. Immunol. 174:4781; Zhu X y col. 2006 J. Immunol. 176:3223; Belmont y col. 2006 Clin. Immunol. 121:29; Finney y col. 2004. J. Immunol. 172: 104; Brentjens y col. 2007 Clin Cancer Res. 13, 5426; Zhang y col. 2004. Cancer Gene Therapy 11, 487). Los enlazadores de

péptidos adicionales se pueden posicionar entre el TCRsc y los dominios de la proteína de fusión y/o entre diferentes dominios de la proteína de fusión para proporcionar una óptima producción, solubilidad, actividad biológica, interacciones proteína-proteína, multimerización o posicionamiento de los respectivos dominios para impedir la interferencia estérica.

- 5 Las construcciones de fusión de los TCRsc se clonaron en un vector de expresión cadena abajo de una secuencia líder para permitir la expresión soluble o en la membrana celular. El vector contiene secuencias reguladoras promotoras/potenciadoras y secuencias poli A para permitir la expresión de genes apropiados y genes que codifican marcadores de selección para permitir el aislamiento de células hospedadoras que contienen el vector de expresión.

10 La secuencia proteica del AL9scTCR de tipo silvestre (no mutado), denominada tipo silvestre o "wt" (por las siglas del inglés, *wild type*), se muestra en la Figura 1A. La secuencia proteica del AL9scTCR que contiene una mutación de Tyr a His en la posición 93 de la cadena V α del TCR, denominada mutación única o "sm" (por las siglas del inglés, *single mutant*), se muestra en la Figura 1B. La secuencia proteica del AL9scTCR que contiene una mutación de Tyr a His en la posición 93 y una mutación de Ser a Pro en la posición 39 de la cadena V α del TCR, denominada mutación doble o "dm" (por las siglas del inglés, *double mutant*), se muestra en la Figura 1C. En la Figura 2A-C se muestran las secuencias correspondientes de ácidos nucleicos de AL9scTCR wt, sm y dm. Las secuencias proteicas para la secuencia líder, diversos dominios de proteína de fusión soluble y secuencias enlazadoras se muestran en la Figura 3A- C, mostrándose las correspondientes secuencias de ácido nucleico en la Figura 4A-C.

Ejemplo 2: Producción y purificación de proteínas

20 Para la producción de las proteínas de fusión en células de mamífero, células HEK-294 o CHO se transfectaron con los vectores de expresión usando lipofectamina 2000. Se seleccionaron clones de una sola célula mediante clonación por dilución limitante, en un medio que contenía G418 (2 mg/ml).

25 El tipo silvestre de AL9scTCR-birA y las proteínas de fusión mutantes se purificaron de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de inmunoafinidad, usando el anticuerpo anti-TCR humano C β mAb (BF1) 8A3.31, acoplado a una columna Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences). Las proteínas de fusión purificadas se biotinilaron con biotina-proteína ligasa (Avidity) en presencia de exceso de biotina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para crear monómeros de AL9sm/birA. La proteína AL9scTCR birA biotinilada se multimerizó con estreptavidina conjugada con R-PE (Jackson Immunoresearch) a una proporción molar TCR/estreptavidina de 4:1 durante al menos 60 minutos a 4 °C.

30 La AL9scTCR-birA de tipo silvestre purificada y las proteínas de fusión mutantes se analizaron con SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie G-250. El análisis del gel SDS de las proteínas en condiciones reductoras y no reductoras mostró que las proteínas eran monoméricas y que tenían un peso molecular aproximado de 52 kD. Este peso es mayor que el peso molecular calculado de 44,3 kD, lo que sugiere que estas proteínas están glicosiladas.

35 Las proteínas de fusión AL9scTCR birA se biotinilaron usando biotina proteína ligasa. La eficacia con la que las proteínas de tipo silvestre y las mutantes se biotinilaron se comparó en un ELISA usando el anticuerpo BF1 para la captura y SA-HRP para la detección. Los resultados mostraron que ambas proteínas se biotinilaron a un nivel similar.

Las fusiones AL9scTCR-IgG1 se componen de TCR directamente enlazados con el dominio constante de la cadena de la IgG1 humana. Los restos de cisteína en la región bisagra de la IgG están intactos, permitiendo la formación de dímeros, que se observa cuando se analizan las proteínas en un SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

40 *Ejemplo 3: Caracterización de proteínas de fusión AL9scTCR mutantes mediante ensayos ELISA de concentración y de actividad de unión al péptido-MHC*

45 Las fusiones de AL9scTCR de tipo silvestre y mutantes producidas en cultivos celulares a corto plazo se evaluaron con respecto a la concentración de proteína TCR y actividad de unión a los tetrámeros péptido-MHC mediante ensayos ELISA. En estos ensayos, se recubrieron placas Maxisorb de 96 pocillos (Nunc, Rochester, N.Y.) con el mAb BF1 (1 μ g/ml). Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían las proteínas de fusión se añadieron a las placas bloqueadas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar, se detectaron las proteínas usando péptido AL9-HLA-A2 tetrámero-HRP (0,5 μ g/ml) para la actividad de unión o el anticuerpo biotinilado anti-TCR C β humano mAb W4F (0,5 μ g/ml) seguido de estreptavidina-HRP (0,5 μ g/ml) para la concentración de la proteína TCR. El sustrato ABTS se unió después y la absorbancia se midió a 405 nm usando un lector de placa de 96 pocillos (Bio-Tek Instruments).

50 Se caracterizaron diversas mutaciones en las posiciones 93 y 97 de la cadena V α del TCR en estos ensayos tal como se muestra en la Figura 5. La mayoría de las mutaciones en la posición 93 dieron como resultado niveles más altos de proteína en los cultivos celulares a corto plazo, indicando niveles de expresión más altos y/o un aumento en la estabilidad de las proteínas. Asimismo, diversas de las mutaciones también dieron como resultado un aumento en la unión al tetrámero péptido AL9-HLA-A2, indicando una actividad de unión mejorada. Por el contrario, los cambios en la posición 97 (Figura 5) o en otras posiciones en cualquiera de las regiones CDR3 α o CDR3 β , no mejoraron la actividad de unión. Cuando se normalizó la actividad de unión a los niveles de proteínas, las mutaciones en Y93 a L,

K, Q o H mostraron niveles significativamente más altos de la actividad de unión de AL9-HLA-A2 en comparación con los de la proteína AL9scTCR wt. La sustitución de Y93 a H en el bucle de CDR3 α produjo un TCR que tenía la mejor afinidad en comparación con el TCR de tipo silvestre y se caracterizó adicionalmente. Los estudios previos mostraron que la proteína AL9scTCR wt era sensible a la temperatura, de manera que la proteína no se observó a altos niveles en medios después de la producción en condiciones de cultivo celular a 37 °C. Los niveles de proteínas AL9scTCR sm (Y93H) y wt producidos mediante células CHO transfectadas se examinaron en cultivos a corto plazo mantenidos a temperatura ambiente o a 37 °C. Tal como se muestra en la Figura 6, la AL9scTCR sm mostró niveles mucho más altos de proteína expresada en cultivos de CHO a 37 °C que la proteína AL9scTCR wt, indicando una mejora en la producción y/o estabilidad de la proteína. De nuevo, la AL9scTCR sm mostró mejor unión al complejo AL9-HLA-A2 que la proteína AL9scTCR wt y cuando se normalizaron a los niveles de proteína, indicando que la proteína Y93H AL9scTCR sm producida a temperatura ambiente o a 37 °C mostró actividad de unión más alta que la proteína wt.

Se usaron procedimientos similares para caracterizar la mutación S39P en la cadena V α del TCR. Tal como se muestra en la Figura 7, la AL9scTCR S39P expresada mediante células CHO transfectadas en cultivos a corto plazo mostró mayor actividad de unión al complejo AL9-HLA-A2 que la proteína AL9scTCR wt. Cuando se combinaron las mutaciones S39P y Y93H en una única AL9scTCR, la doble mutación resultante mostró mejor productividad, estabilidad a 37 °C y actividad de unión al complejo AL9-HLA-A2 que las proteínas AL9scTCR de mutación única o wt (Figura 8). Se observaron resultados similares con proteínas purificadas de sobrenadantes de células CHO mediante cromatografía de afinidad por mAb BF1. Tanto las construcciones sm como las dm de la AL9scTCR mostraron mejor estabilidad a 37 °C y aumentaron su actividad de unión al complejo AL9-HLA-A2 en comparación con la proteína AL9scTCR wt (Figura 9).

Ejemplo 4: Caracterización de las proteínas de fusión AL9scTCR mutantes mediante citometría de flujo

Se midió, mediante citometría de flujo, la unión funcional de las proteínas de fusión AL9scTCR wt y mutante con células presentadoras de antígeno (células T2) positiva a HLA-A2 y cargadas con el péptido AL9. Las células T2 se cargaron con 50 μ M del péptido AL9 consenso durante 3 horas, a 37 °C. Las proteínas AL9scTCR-birA biotiniladas que se habían multimerizado mediante la adición de SA-PE se añadieron a diferentes concentraciones de 1 a 0,001 μ g durante 30 minutos a 4 °C. Después de una etapa de lavado, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo de barrido de FACS usando el programa informático CellQuest (BD Biosciences). Tal como se muestra en la Figura 10A, los multímeros AL9scTCR-birA sm mostraron una actividad de unión 2-3 veces más alta por las células cargadas con el péptido AL9 que los multímeros AL9scTCR-birA wt cuando la concentración de TCR fue <0,5 μ g/ensayo.

Las formas monoméricas de las fusiones AL9scTCR-birA wt y sm se usaron también para detectar el péptido-MHC en la superficie de las células diana, en el mismo experimento. Las células T2 se cargaron con el péptido AL9 50 μ M tal como se describe anteriormente. Las formas biotiniladas de los TCR con AL9 wt y AL9 sm se añadieron en cantidades molares equivalentes como con las formas multiméricas que varían de 1 a 0,001 μ g. Después de una etapa de lavado los monómeros unidos se detectaron con SA-PE. Hubo una unión 2-3 veces más alta del monómero AL9scTCR sm en comparación con la del monómero de tipo silvestre a 0,5-1 μ g. Esta diferencia aumentó hasta 4-8 veces a concentraciones de 0,25 a 0,06 μ g y 20-30 veces a concentraciones de 0,03 a 0,001 μ g. Por lo tanto, la diferencia entre la AL9scTCR de tipo silvestre y la AL9scTCR sm fue particularmente evidente cuando se usó la forma monomérica del scTCR (Figura 10A). Hubo una pequeña unión o inexistente tanto de los monómeros o tetrámeros de TCR de tipo silvestre o mutante con células inactivas incluso a la concentración más alta. Estudios similares realizados con la fusión AL9scTCR-birA dm mostraron que esta proteína también mostraba un aumento de la actividad de unión con células T2 cargadas con el péptido AL9 en comparación con la AL9scTCR wt (Figura 10B). Asimismo, tanto las fusiones AL9scTCR-birA sm como dm fueron capaces de unirse al péptido AL9 presentado mediante los linfocitos B HLA-A2+ (Figura 10C). En estos estudios, el péptido 264scTCR y el p53 aa264-272 se usaron como reactivos de control negativo para evaluar el TCR y se observaron la especificidad del péptido y las especificidades esperadas. En conjunto, estos datos confirman que las AL9scTCR son biológicamente funcionales en el formato de cadena única de tres dominios y que la fusión AL9scTCR sm y dm se une específicamente a células cargadas con el péptido AL9 con mayor afinidad que la AL9scTCR de tipo silvestre.

La interacción específica entre las proteínas AL9scTCR birA sm o de tipo silvestre y el péptido-MHC afín se confirmó mediante el análisis de su unión a un panel de péptidos control irrelevantes. Las células T2 se cargaron con el péptido AL9 consenso o con los péptidos de gag del VIH-1 (77-85), pol (464-472), CMV, núcleo del VHC, env del VHB, p53 (264-272), MART-1 o se dejaron inactivas. La AL9scTCR de tipo silvestre biotinilada, la AL9scTCR sm o la MART1scTCR control se añadieron después, seguido de una incubación con estreptavidina-PE. No se observó ninguna unión de las AL9scTCR de tipo silvestre o sm a ningún péptido irrelevante (Figura 10D). Por lo tanto, la mayor afinidad de la AL9scTCR sm no compromete su especificidad de unión a péptidos.

Se analizó la capacidad de las proteínas de fusión AL9scTCR-birA de tipo silvestre o sm para competir entre sí por la unión a las células T2 cargadas con el péptido AL9. La unión de la AL9scTCR biotinilada de tipo silvestre o sm se determinó en presencia o ausencia de un exceso de 2-100 veces de competidor no biotinilado. El mutante sencillo de alta afinidad pudo competir con la AL9scTCR de tipo silvestre de forma muy eficaz incluso con un exceso de 2 veces, tal como se muestra en la Figura 11. Las concentraciones más altas de exceso de 5-10 veces fueron solo

ligeramente mejores y se produjo una anulación casi completa de la unión de la AL9scTCR wt con exceso de 25 veces del mutante. Por el contrario, la AL9scTCR de tipo silvestre no pudo competir de forma eficaz con la AL9scTCR sm. Con un exceso de 10 veces o menos del tipo silvestre hubo una pequeña inhibición o no hubo. Con un exceso de 25-100 veces, se observó alguna inhibición, pero no fue muy significativa. Por lo tanto, la AL9scTCR de tipo silvestre no puede bloquear de forma eficaz la unión de la AL9scTCR sm incluso a altas concentraciones, pero el mutante es un buen competidor de la AL9scTCR wt incluso en un exceso de 2 veces. Estos datos confirman la conclusión de que la AL9scTCR sm tiene mayor actividad de unión al complejo AL9-HLA-A2 y puede inhibir la unión de la AL9 TCR wt.

La sensibilidad de las fusiones AL9scTCR-birA wt y sm se evaluó comparando su capacidad para detectar diversas cantidades de péptido en la superficie celular. Las células T2 se cargaron con el péptido AL9 a concentraciones que variaban de 12 nM a 100 µM. Después, se añadieron 0,5 µg de AL9scTCR-birA wt o sm monomérica y se evaluó la unión mediante citometría de flujo. Para estimar el número de moléculas PE unidas por célula, la intensidad media fluorescente obtenida a diversas concentraciones de péptido se comparó con una curva patrón de PE acoplada con perlas de calibración, que tienen cantidades conocidas de PE por perla. Tal como se muestra en la Figura 12, hay un aumento significativo de la capacidad de la AL9scTCR sm en comparación con la AL9scTCR wt para detectar las células T2 cargadas con el péptido AL9, a todas las concentraciones de péptido ensayadas. La AL9scTCR sm pudo teñir las células T2 cargadas con tan solo 12 nM de péptido AL9 mientras que el TCR de tipo silvestre solo pudo detectar 195 nM de péptido en la superficie de las células T2. Se observaron resultados similares con la fusión AL9scTCR dm.

Ejemplo 5: Caracterización de la unión de las proteínas de fusión AL9scTCR mutantes a las variantes del péptido AL9

Las estructuras cristalinas de los complejos TCR-péptido/HLA-A2 han sugerido que los aminoácidos en el centro de un péptido de 9 meros establecen contactos con las regiones CDR3 del TCR. Con el fin de determinar qué aminoácidos peptídicos son importantes en la unión de los TCR de tipo silvestre y mutantes, se hicieron sustituciones de alanina en las posiciones 60, 62, 64, 65, 66 y 67 del péptido AL9 (aminoácidos 59-67: AIIRILQQL). La unión relativa (CI50) de estas variantes con complejos HLA-A2 se evaluó mediante análisis de competición tal como se describe anteriormente (Altfeld y col. 2005. J. Virol. 79: 5000) y se indica para cada péptido en la Figura 13. Estos péptidos se cargaron en células T2 y las células se tiñeron con los multímeros AL9scTCR wt y sm tal como se describe anteriormente. El análisis de citometría de flujo se realizó para evaluar la afinidad de unión relativa de los multímeros AL9scTCR wt y sm por el péptido consenso y las células cargadas con las variantes peptídicas. El multímero 264scTCR sirvió como un reactivo control.

Los resultados mostraron que el reemplazo de aminoácidos en las posiciones 60, 65, 66 y 67 no dieron como resultado ninguna diferencia en la unión entre las AL9scTCR wt y sm (Figura 13). Sin embargo, la sustitución de la Leu en la posición 64 con Ala disminuyó significativamente la unión del tipo silvestre, pero no la de la AL9scTCR sm. Esto sugiere que la posición 64 puede ser un contacto crucial para el TCR nativo, pero no para el mutante de alta afinidad.

El reemplazo de Arg en la posición 62 por Ala dio como resultado un péptido insoluble, mientras que una sustitución de Glu en esta posición fue soluble. Esta sustitución anuló por completo la unión de los multímeros AL9scTCR tanto wt como sm tanto en los formatos monoméricos como tetraméricos, sugiriendo que hay un contacto crítico para la interacción TCR-péptido tanto en el tipo silvestre como en el mutante.

Las diferentes variantes de origen natural del epítipo AL9 en el VIH se han comunicado en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). El análisis de las variantes que se dan con más frecuencia, muestran variantes de sustitución de isoleucina a leucina en la posición 60 y de treonina a metionina en las posiciones 61 y 63 (Figura 14A, Altfeld y col. 2005. J. Virol. 79: 5000). Se sintetizaron los péptidos que se corresponden con esta y otras variantes, y se comparó la unión de los AL9scTCR con células cargadas con la variante del péptido mediante citometría de flujo en una serie de estudios que se muestran en la Figura 14B. Como anteriormente, las células T2 se cargaron con el AL9 consenso o las variantes peptídicas (50 µM cada una) durante 3 horas, a 37 °C, y se tiñeron con los multímeros AL9scTCR wt, sm o dm marcados con PE.

El multímero AL9scTCR wt mostró una unión reducida a las variantes del AL9 con sustituciones de Thr y Met en la posición 63. Por el contrario, los multímeros AL9scTCR sm y dm mostraron una buena unión a estas variantes. La sustitución de las posiciones 60 y 61 en el péptido AL9 no afectó a la unión del AL9scTCR wt ni al sm. La titulación del péptido I63M a concentraciones de 50 µM - 0 nM confirmó que el AL9scTCR sm, pero no el tetrámero de TCR de tipo silvestre, pudo reconocer esta variante, tal como se muestra en la Figura 14C.

Dado que la sustitución en la posición 62 a Glu ha demostrado que anula la unión tanto del AL9scTCR de tipo silvestre como del mutante, fue de interés determinar qué efecto tendría la sustitución de Arg con Lys en la unión de estos TCR. En la base de datos, esta sustitución se ha comunicado como una variante de VIH de origen natural. Una sustitución de Lys en la posición 62 disminuyó significativamente la unión del tipo silvestre, pero no la alta afinidad del multímero AL9scTCR sm (Figura 14B).

Por lo tanto, los AL9scTCR sm y dm no solo se unen al péptido AL9 consenso con una alta afinidad, estas proteínas también pueden reconocer variantes en la posición 62, 63 y 64 mucho mejor que el AL9 TCR de tipo silvestre (Figura 14B). La figura 14D ilustra un resumen de la actividad unión relativa de los multímeros AL9scTCR wt y sm con las variantes normales del epítipo AL9 en comparación con el péptido consenso AL9. El AL9scTCR sm mantiene su actividad de unión con estas variantes a >70 % en comparación con la observada para el péptido consenso, indicando que esta proteína de fusión de TCR mutante puede ser capaz de reconocer las células infectadas por VIH que presentan estas variantes de epítipos.

Ejemplo 6: Detección de la presentación del antígeno AL9 en linfocitos T humanos infectados por VIH mediante las proteínas de fusión AL9scTCR

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que las proteínas AL9scTCR wt y mutante fueron capaces de unirse al complejo péptido AL9-HLA-A2 y de añadir de forma endógena el péptido AL9 presentado en las células HLA-A2+. Sin embargo, con el fin de dirigirse a las células infectadas por VIH, las proteínas de fusión TCR deben ser sensibles y lo suficientemente específicas para detectar el AL9 presentado en la superficie celular que se genera mediante la ruta presentadora de antígeno para expresar de forma interna la proteína vpr del VIH. Para examinar esto, se aislaron linfocitos T CD4+ de donantes HLA-A*0201 mediante perlas magnéticas (Miltenyi Biotech) y se estimularon con medios que contenían CD3 (OKT3; Coulter), anti-CD28 (PharMingen), e IL-2, tal como se describe anteriormente (Migueles y col. 2002 Nat Immunol 3: 1061). El día 3, se infectaron 5×10^6 células con 5.000 TCID₅₀ de HIVSF₁₆₂ en 200 µl de medios durante 1 hora a 37 °C y después se mantuvieron en un cultivo a 10^6 células/ml en placas de 24 pocillos durante 6 días más. El día 6, los linfocitos T CD8+ se drenaron usando perlas magnéticas. El porcentaje de células infectadas se documentó mediante tinción intracelular para p24 con Kc57-FITC o Kc57-RD1 (Coulter). Las células infectadas se tiñeron después con los multímeros AL9scTCR wt y sm y anti-CD4 mAb-APC. Las infecciones por VIH dieron como resultado una regulación negativa de la expresión de CD4 en la superficie celular. Por lo tanto, la presentación del péptido AL9 se puede evaluar en células infectadas con bajos niveles de tinción de CD4. Tal como se muestra en la Figura 15, los multímeros AL9scTCR-birA wt y sm fueron capaces de detectar el péptido AL9 presentado mediante linfocitos T infectados por VIH. Hubo un aumento de 15 veces en el porcentaje de células con tinción positiva del AL9scTCR wt y un aumento de 27 veces en el porcentaje de células con tinción positiva del AL9scTCR sm cuando se compararon las células infectadas con las no infectadas. Asimismo, la tinción de AL9scTCR aumentada se observó en células que tenían una baja regulación de CD4. En este estudio, el multímero AL9scTCR-birA sm detectó aproximadamente 2 veces más células infectadas por VIH que el multímero AL9scTCR-birA wt, coherente con la actividad de unión aumentada del TCR mutante para el péptido AL9.

Ejemplo 7: Caracterización de la unión de las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig al péptido AL9 y a las variantes peptídicas

Tal como se indica anteriormente, las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig se produjeron y purificaron. La actividad de unión de la fusión AL9scTCR-Ig dm se comparó con las fusiones AL9scTCR-birA wt y sm usando células T2 cargadas con AL9. En este ensayo se detectó la unión de TCR usando un mAb BF1 biotinilado seguido de SA-PE. Tal como se muestra en la Figura 16A, la proteína de fusión AL9scTCR-Ig dm mostró una buena unión con las células T2 cargadas con el péptido AL9 consenso o con la variante AL9 I63M. De hecho, el dímero AL9scTCR-Ig dm mostró una mejor unión con la variante AL9 I63M que con el monómero de fusión AL9scTCR-birA sm. La actividad de unión de las fusiones AL9scTCR-Ig dm y sm se comparó con la de los multímeros AL9scTCR-birA wt y con la de las fusiones AL9scTCR-Ig wt usando células T2 cargadas con el AL9 consenso y con la variante AL9 I63M (Figura 16B-C). Estos estudios verificaron que las fusiones AL9scTCR-Ig dm y sm mostraron una mejor unión con el AL9 y variantes de AL9 que con la proteína AL9scTCR wt. Es interesante destacar que la proteína de fusión AL9scTCR-Ig dm muestra menos unión de fondo con células T2 inactivas que con cualquiera de las fusiones AL9scTCR-Ig wt o sm (Figura 16C). La mayor tinción de fondo de la fusión AL9scTCR-Ig wt o sm se debe probablemente a la unión del dominio Fc de la Ig con receptores en células T2. No se observó diferencia en la unión de fondo entre las proteínas AL9scTCR dm y sm con el formato multimérico de fusión de birA, sugiriendo que la mutación TCRα FR2 en el doble mutante en el formato Ig da como resultado una menor actividad de unión no específica. Este efecto es ventajoso para dirigir la actividad biológica específica.

Ejemplo 8: Las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig median la actividad citotóxica específica del péptido AL9

Se examinó la capacidad de las fusiones AL9scTCR-Ig wt, dm y sm para dirigir citotoxicidad celular dependiente de Fc frente a células diana cargadas con AL9. En estos ensayos, las fusiones AL9scTCR-Ig actúan para conjugar el receptor Fc que llevan las células efectoras inmunitarias y el péptido-MHC que presenta las células diana y las células efectoras median la lisis de las células diana a través de un mecanismo similar a la ADCC. Las PBMC humanas, que en este ejemplo sirven como células efectoras inmunitarias, se aislaron de capas leucocitoplquetarias de sangre humana mediante un gradiente de centrifugación a través de HistoPaque (Sigma-Aldrich). Las células T2 activadas con péptido a 50 µg/ml a 37 °C durante 2 horas se usaron como células diana. Las células diana se marcaron con calceína-AM a 200 µg/ml a 37 °C durante 1 hora, se lavaron dos veces y se añadieron a placas de 96 pocillos en forma de U a 20000/pocillo en medio RPMI-10. Los AL9scTCR-Ig dm, sm y wt se añadieron a los pocillos a diferentes concentraciones. Las células efectoras se añadieron después (proporción E:T de 100:1) y el cultivo se incubó a 37 °C durante 2 horas. La intensidad de fluorescencia (IF) de la calceína liberada

en el sobrenadante mediante lisis celular se midió con un lector de placa fluorescente (longitud de onda de la excitación = 485 nm; longitud de onda de emisión = 538 nm; límite = 530 nm). La citotoxicidad específica se calculó usando la siguiente fórmula: porcentaje de citotoxicidad = (IF de la muestra de ensayo - IF de las células diana con medio) ÷ (IF de las células diana tratadas con Triton X-100 0,04 % - IF de las células diana con medio) x 100.

- 5 Tal como se muestra en la Figura 17A, la proteína de fusión AL9scTCR-Ig dm dirige de forma eficaz una actividad citolítica de PBMC humanas frente a células T2 activadas con el péptido AL9 pero no frente a células T2 activadas con el péptido p53 264-272. Una proteína de fusión 264scTCR-Ig control no mostró la misma actividad frente a las células T2 cargadas con AL9, demostrando la especificidad de este ensayo. Se vieron resultados similares con diferentes preparaciones de PBMC. La Figura 17B muestra ensayos de citotoxicidad adicionales que comparan la actividad de las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig dm, sm y wt frente a células T2 cargadas con AL9. Los resultados indican que las fusiones AL9scTCR-Ig dm y sm fueron eficaces en la mediación de una actividad similar a la ADCC frente a células cargadas con AL9 mientras que la fusión AL9scTCR-Ig wt no lo fue. Estos resultados indican que los mutantes de las AL9scTCR confieren una bioactividad citolítica frente a células que presentan el epítipo AL9 del VIH que no se observa con el AL9 TCR wt.
- 10
- 15 De manera similar, se evaluará la capacidad de las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig mutantes para dirigir la actividad citolítica de las células efectoras inmunitarias frente a células infectadas por VIH. Las células infectadas por VIH se generarán tal como se describe en el Ejemplo 6 y se usarán como células diana en los ensayos de liberación de calceína tal como se describe anteriormente. Un aumento específico en la lisis de las células infectadas por VIH debido a la presencia de la fusión AL9scTCR-Ig mutante en el medio de cultivo podría demostrar que la fusión AL9scTCR-Ig mutante puede actuar como una molécula puente, dirigiendo la actividad citolítica inmunitaria contra las células infectadas por VIH.
- 20

Ejemplo 9: Las proteínas de fusión AL9scTCR mutantes muestran una afinidad aumentada por los complejos AL9/HLA-A2.

- 25 Los parámetros de afinidad de unión de las interacciones de los complejos AL9/HLA-A2 con la proteína de fusión AL9scTCR se determinaron mediante procedimientos de resonancia de plasmón superficial. El AL9 biotilado o los complejos I63M pMHC o los complejos pMHC de control irrelevante se unieron a una superficie de microplaca detectora con estreptavidina. Se permitió que las proteínas TCR-birA solubles fluyeran sobre las células relevantes y se registraron en tiempo real las respuestas que miden las interacciones proteína-proteína usando la tecnología BIAcore. Los parámetros de unión se estimaron usando el programa informático BIAevaluation. En la Tabla 1 se muestran los resultados de estos análisis para las proteínas de fusión AL9scTCR-birA y en la Tabla 2 se muestran los de las proteínas de fusión AL9scTCR-Ig. Los resultados indican claramente que la proteína AL9scTCR sm como una fusión con birA o Ig tiene un aumento de la afinidad de unión por los complejos AL9/HLA-A2 e I63M AL9/HLA-A2. Asimismo, las fusiones AL9scTCR-Ig sm diméricas presentan mejor unión a los complejos AL9/HLA-A2 que las moléculas AL9scTCR-birA sm monoméricas debido a su aumento de avidéz.
- 30

- 35 Tabla 1. Afinidades de unión de las fusiones AL9scTCR-birA wt y sm por el péptido AL9 y las variantes I63M AL9 formando complejo con moléculas de HLA-A2

Constantes	AL9scTCR birA wt	AL9scTCR-birA sm
<i>AL9-HLA-A2</i>		
	1,8 µM	120 nm
$K_{on}(M^{-1}S^{-1})$	9440	30200
$K_{d}(S^{-1})$	$1,75 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$
<i>I63M AL9-HLA-A2</i>		
K_D	Sin unión	6 µM

Tabla 2. Afinidades de unión de las fusiones AL9scTCR-Ig wt y sm por el péptido AL9 y las variantes I63M AL9 formando complejo con moléculas de HLA-A2

Constantes	AL9scTCR Ig wt	AL9scTCR Ig sm
<i>AL9-HLA-A2</i>		
K_D	83,4 nm	58,9 nm
$K_{on}(M^{-1}S^{-1})$	$2,62 \times 10^4$	$2,01 \times 10^4$

(continuación)

Constantes	AL9scTCR Ig wt	AL9scTCR Ig sm
<i>AL9-HLA-A2</i>		
$K_d(s^{-1})$	$2,18 \times 10^3$	$1,19 \times 10^3$
<i>I_{63M} AL9-HLA-A2</i>		
K_D	Sin unión	224 nm
$K_{on}(M^{-1}s^{-1})$		$2,98 \times 10^4$
$K_d(s^{-1})$		$6,67 \times 10^{-3}$

Ejemplo 10: Estrategias de transferencia génica y estrategias basadas en células usando AL9 TCR mutantes para eliminar células infectadas por VIH.

- 5 Los TCR de la invención podrían usarse en estrategias de terapia génica o en estrategias terapéuticas basadas en células para eliminar células infectadas por VIH o prevenir o tratar la infección por VIH. Por ejemplo, los genes de TCR que codifican el AL9 TCR mutante y los dominios de señalización transmembrana y citoplasmáticos se transferirán a células inmunitarias de manera que las células inmunitarias expresen ahora el AL9 TCR de alta afinidad en la superficie celular. Estas células se volverán activas para expresar funciones inmunitarias cuando el
- 10 AL9 TCR interactúe con el péptido vpr del VIH presentado en el complejo HLA-A2. Estas células se usarán en la eliminación de células infectadas por VIH *ex vivo* o, después de su infusión en pacientes con infección por VIH, eliminando células infectadas por VIH en el paciente. Como alternativa, los genes de TCR en los vectores apropiados se administrarán directamente a los pacientes, permitiendo de este modo la transferencia de genes en las células inmunitarias del paciente y la expresión del AL9 TCR de alta afinidad en la superficie de estas células *in vivo*. Tales células podrían proporcionar actividad protectora o terapéutica frente a la infección por VIH.

En un ejemplo particular, se aislarán PBMC de un paciente infectado por VIH. Los genes de TCR que codifican el AL9 TCR mutante y los dominios de señalización transmembrana y citoplasmáticos se transferirán *ex vivo* en estas células, permitiendo la expresión de los TCR en la superficie celular. Las células inmunitarias se transferirán de nuevo al paciente, donde mediarán funciones efectoras frente a las células infectadas por VIH. La actividad

20 citotóxica de las células inmunitarias frente a las células infectadas por VIH también se ensayarán *in vitro* usando los ensayos de liberación de calceína descritos anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de linfocitos T aislado (TCR) que se une específicamente a un epítipo del VIH que tiene la secuencia peptídica AIIRILQQL de la vpr del VIH-1, en el que el TCR comprende la secuencia Valfa del TCR representada en la Figura 1B o 1C o una secuencia del TCR de tipo silvestre representada en la Figura 1A con una mutación S39P.
- 5 2. El TCR de la reivindicación 1, en el que el TCR comprende adicionalmente una fusión con un dominio polipeptídico funcional, un agente de diagnóstico/formador de imágenes, una nanopartícula que contiene fármaco, un agente terapéutico, un agente citotóxico o agente antivírico.
3. Una molécula de ácido nucleico que codifica el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
- 10 5. Un procedimiento *in vitro* para detectar células infectadas por VIH que comprende:
poner en contacto una célula con el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o con la célula hospedadora de la reivindicación 4; y determinar si el TCR se une a la célula;
en el que la unión del TCR con la célula es indicativa de infección por VIH.
6. Un procedimiento *in vitro* para eliminar una célula infectada por VIH que comprende:
15 poner en contacto la célula con un TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o con la célula hospedadora de la reivindicación 4, eliminando de ese modo la célula infectada con VIH.
7. Un TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o el ácido nucleico de la reivindicación 3 o la célula hospedadora de la reivindicación 4 para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene VIH.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, el ácido nucleico de la reivindicación 3, o la célula hospedadora de la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un kit que comprende el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, el ácido nucleico de la reivindicación 3, o la célula hospedadora de la reivindicación 4 e instrucciones para su uso.

Figura 1A. Secuencia de la proteína AL9scTCR de tipo silvestre (CDR en cursiva)

-CDR1--

--

GEDVEQSLFL SVREGDSSVI NCTYTDSSST YLYWYKQESG

AGLQLLTYIF

<-----TCR V α (TRAV5/TRAVJ36)----->

CDR2 ---CDR3---

--

SNMDMKQDQR LTVLLNKKDK HLSLRIADTQ TGDSAIYFCA

ETYQTGANL

-----TCR V α -----

-

FFGTGTRLTV IP

---TCR V α ----->

TSGGGSGGG ASGGGSGGG GSSS

<----- Enlazador ----->

-CDR1-

--

EAGVTQFPSH SVIEKGQTVT LRCDPISGHD NLYWYRRVMG

KEIKFLLHFV

<-----TCR V β (TRBV14/TRBJ2-1)----->

--

CDR2 ---

CDR3-

KESKQDESGM PNNRFLAERT GGTYSTLKVQ PAELED SGVY
FCASSQGVTL
-----TCR V β -----

LNEQFFGPGT RLTVL
-----TCR V β ----->

EDLNKVFPE VAVFEPSEAE ISHTOKATLV CLATGFFPDH
VELSWVWNGK
<-----TCR C β -----
--

EVHSGVSTDP OPLKEOPALN DSRVCLSSRL RVSATFWONP
RNHFERCOVQF
-----TCR C β -----

YGLSENDEWT ODRAKPVTQI VSAEAWGRAD
-----TCR C β ----->

Figura 1B. Secuencia de la proteína AL9scTCR con una única mutación (Y93H)

```

GEDVEQSLFL SVREGDSSVI NCTYTDSSST YLYWYKQESG
AGLQLLTYIF
<-----TCR V $\alpha$ -----
---

SNMDMKQDQR LTVLLNKKDK HLSLRIADTQ TGDSAIFYCA
ETHQTGANNL
-----TCR V $\alpha$ ----- ^
---

mutación
FFGTGTRLTV IP
----TCR V $\alpha$ ----->

TSGGGGSGGG ASGGGGSGGG GSSS
<-----Enlazador----->

EAGVTQFP?SH SVIEKGQTVT LRCDFISG?ID NLYWYRRVMG
KEIKFLLHFV
<-----TCR V $\beta$ -----
---

KESKQDESGM PNNRFLAERT GGTYSTLKVQ PAELED SGVY
FCASSQVTL
-----TCR V $\beta$ -----
---

LNEQFFG?GT RLTVL
-----TCR V $\beta$ ----->

EDLNKVF?PE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFFPDH
VELSWVWVNGK

```

Y>H

<-----TCR C β -----
--
EVHSGVSTDP OPLKEOPALN DSRVCLSSRL RVSATFWONP
RNHFERCOVOF
-----TCR C β -----

YGLSENDEWT ODRAKPVTQI VSAEAWGRAD
-----TCR C β ----->

Figura 1C. Secuencia de la proteína AL9scTCR con doble mutación (S39P, Y93H)

GEDVEQSLFL SVREGDSSVI NCTYTDSSST YLYWYKQEPG
AGLQLLTYIF
 <-----TCR V α -----^-----

 S>P mutación

SNMDMKQDQR LTVLLNKKDK HSLRIADTQ TGDSAIYFCA
ETHQTGANNL
 -----TCR V α -----^-----

 Y>H
 mutación

FFGIGTRLTV IP
 ----TCR V α ----->

TSGGGGSGGG ASGGGGSGGG GSSS
 <-----Enlazador----->

EAGVTOFPPSH SVIEKGQTVT LRCDPISGHD NLYWYRRVMG
KEIKFLLHFV
 <-----TCR V β -----

KESKQDESGM PNNRFLAERT GGTYSTLKVQ PAELED SGVY
FCASSQGVTL
 -----TCR V β -----

LNEQFFGPGT RLTVL
 -----TCR V β ----->

EDLNKVFPEPE VAVFEPSEAE ISHTOKATLV CLATGFFPDH
VELSWVWNGK

<-----TCR C β -----

--

EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP
RNHFERCQVQF

-----TCR C β -----

YGLSENDEWT ODRAKPVTQI VSAEAWGRAD

-----TCR C β ----->

Figura 2A. Secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR de tipo silvestre (CDR en cursiva)

GGAGAGGATGTGGAGCAGAGTCTTTTCTGAGTGTCCGAGAGGGAGACAGCTCCGTT
AT

<-----TCR V α (TRAV5/TRAVJ36)-----
--

-----CDR1-----

AAACTGCACTTACACAGACAGCTCCTCCACCTACTTATACTGGTATAAGCAAGAATC
TG

-----TCR V α -----
--

-----CDR2-----

GAGCAGGTCTCCAGTTGCTGACGTATATTTCTCAAATATGGACATGAAACAAGACC
AA

-----TCR V α -----
--

AGACTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAGAC
AC

-----TCR V α -----
--

-----CDR3-----

CCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACTTCTGTGCAGAGACTTATCAAACCTGGGGCAAAA
CA

ES 2 625 985 T3

-----TCR V α -----
--

ACCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTATCCCAGTAGTGGAGGGGGTG
GA

----TCR V α -----><---Enlazador-----
--

AGCGGGGGTGGTGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCCAAGCGAA
GC

-----Enlazador-----><---
--

TGGAGTTACTCAGTTCCCCAGCCACAGCGTAATAGAGAAGGGCCAGACTGTGACTCT
GA

-----TCR V β (TRBV14/TRBJ2-1) -----
--

-----CDR1-----

GATGTGACCCAATTTCTGGACATGATAATCTTTATTGGTATCGACGTGTTATGGGAA
AA

-----TCR V β -----
--

-----CDR2-----

GAAATAAAATTTCTGTTACATTTTGTGAAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCCGGTATG
CC

ES 2 625 985 T3

-----TCR V β -----
--

CAACAATCGATTCTTAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTATTCTACTCTGAAGGTGCA
GC

-----TCR V β -----
--

-----CDR3-----

CTGCAGAACTGGAGGATTCTGGAGTTTATTCTGTGCCAGCAGCCAAGGGGTGACTT
TG

-----TCR V β -----
--

--CDR3-----

TTGAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCGTGCTAGAGGACCTGAAC
AA

-----TCR V β -----><-----TCR C β --
--

GGTGTTCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACAC
CC

-----TCR C β -----
--

AAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGA
GC

ES 2 625 985 T3

-----TCR C β -----

--

TGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCTC
AA

-----TCR C β -----

--

GGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTC
GG

-----TCR C β -----

--

CCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGC
TC

-----TCR C β -----

--

TCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGC
GC

-----TCR C β -----

--

CGAGGCCTGGGGTAGAGCAGAC

-----TCR C β ----->

Figura 2B. Secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR con una única mutación

GGAGAGGATGTGGAGCAGAGTCTTTTCCTGAGTGTCCGAGAGGGA
GACAGCTCCGTTATAAACTGCACTTACACAGACAGCTCCTCCACCTACTTA
TACTGGTATAAGCAAGAATCTGGAGCAGGTCTCCAGTTGCTGACGTATAT
TTTCTCAAATATGGACATGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGA
ATAAAAAGGATAAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGG
GACTCAGCTATCTACTTCTGTGCAGAGACTCATCAAACCTGGGGCAAACAA
CCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTATTCCCCTAGTGGAGG
GGGTGGAAGCGGGGGTGGTGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGC
GGTTCCTCAAGCGAAGCTGGAGTACTCAGTTCCCCAGCCACAGCGTAAT
AGAGAAGGGCCAGACTGTGACTCTGAGATGTGACCCAATTTCTGGACATG
ATAATCTTTATTGGTATCGACGTGTTATGGGAAAAGAAATAAAATTTCTGT
TACATTTTGTGAAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCCGGTATGCCAACAAT
CGATTCTTAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTATTCTACTCTGAAGGTGCA
GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGGAGTTTATTTCTGTGCCAGCAGCCAAG
GGGTGACTTTGTTGAATGAGCAGTTCCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACC
GTGCTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGA
GCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCC
TGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAAT
GGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGG
AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGG
GTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTC
CAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAA
ACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGAC

Figura 2C. Secuencia de ácido nucleico de la AL9scTCR con doble mutación

GGAGAGGATGTGGAGCAGAGTCTTTTCCTGAGTGTCCGAGAGGGA
GACAGCTCCGTTATAAACTGCACTTACACAGACAGCTCCTCCACCTACTTA
TACTGGTATAAGCAAGAACCGGGAGCAGGTCTCCAGTTGCTGACGTATAT
TTTCTCAAATATGGACATGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGA
ATAAAAAGGATAAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGG
GACTCAGCTATCTACTTCTGTGCAGAGACTCATCAAACCTGGGGCAAACAA
CCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTATTCCCAGTAGTGGAGG
GGGTGGAAGCGGGGGTGGTGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGC
GGTTCCTCAAGCGAAGCTGGAGTTACTCAGTTCCCCAGCCACAGCGTAAT
AGAGAAGGGCCAGACTGTGACTCTGAGATGTGACCCAATTTCTGGACATG
ATAATCTTTATTGGTATCGACGTGTTATGGGAAAAGAAATAAAATTTCTGT
TACATTTTGTGAAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCCGGTATGCCCAACAAT
CGATTCTTAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTATTCTACTCTGAAGGTGCA
GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGGAGTTTATTTCTGTGCCAGCAGCCAAG
GGGTGACTTTGTTGAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACC
GTGCTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGA
GCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCC
TGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAAT
GGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGG
AGCAGCCC GCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGG
GTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTC
CAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAA
ACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGAC

Figura 3A. Secuencia líder

METDTLLLVVLLLVVPGSTG

Figura 3B. Varios dominios proteicos para proteínas de fusión solubles

BirA

GGLNDIFEAQKIEWHE

IL-2:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATE
LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD
ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

IgG1:

ASTKGPVSFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
EPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
GQPREPQVYILPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IL-15:

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVLSL
ESGDASIHDIVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQM
FINTS

IL-15R α sushi:

ITC²PPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN
VAHWTTPSLKCIR

INF- α :

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAET
IPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETP
LMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

GM-CSF:

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAEMNETVEVISEMFDLQEP
TCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQTITFESFKEN
LKDFLLVIPFDCWEPVQE

Figura 3C. Varias secuencias de enlazadores

TSGGGGSGGGASGGGGSGGGSSS;

GGGGSGGGSGGGSGGGGS;

VNAKTTAPSVYPLAPVS

Figura 4A. Secuencia de ácido nucleico líder

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTAIGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGT
CCACCGGT

Figura 4B. Secuencias de ácido nucleico del dominio de fusión

BirA:

GGTGGTCTGAACGACATCTTCGAAGCTCAGAAAATTGAATGGCACGAA

IL-2:

GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTAC
TGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAA
ACTCA
CCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGA
ACTGAAACATC
TTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAA
A
GCAAAA
ACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTC
TGGA
ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAA
CCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACAC
TAACT

IgG1:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGIGTCGTGGA
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTG
TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGG
ACACCC
TCAIGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT
CAGCGTCC
TCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC

ES 2 625 985 T3

GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGICTCCGGGTAAA

IL-15:

AAC TGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAAAATGAAGATCTTATTTCAAT
CTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAG
TAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTTACCTTGAGTCCCGAC
ATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGT
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAACTCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAA
AAAATATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATACTGTCCAAATGTTTCATCAACA
CTTCT

IL-15R α sushi:

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGA
GCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAAGCGTAAAG
CCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTCCGIGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACT
GGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

INF- α

TGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCC
TGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACACACATCACTTTG
GATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCC
TCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTG
CTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATG
ACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGG
AGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAG
AGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTT
TTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAAGTAAGGAA

GM-CSF:

GCACCCGCCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATG
CCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGA
ATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTAC
AGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGG
GCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAA
CTTCTGTGCAACCCAGACTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACT
TTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAG

Figura 4C. Secuencia de ácido nucleico líder

ACTAGTGGAGGGGGTGAAGCGGGGTGGTGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCTG
GCGGTGGCGGTTCCCTCAAGC;

GGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTG
GCGGTTCC;

GTTAACGCAAAGACAACCGCCCCTTCAGTATATCCACTAGCGCCCGTT

Figura 5

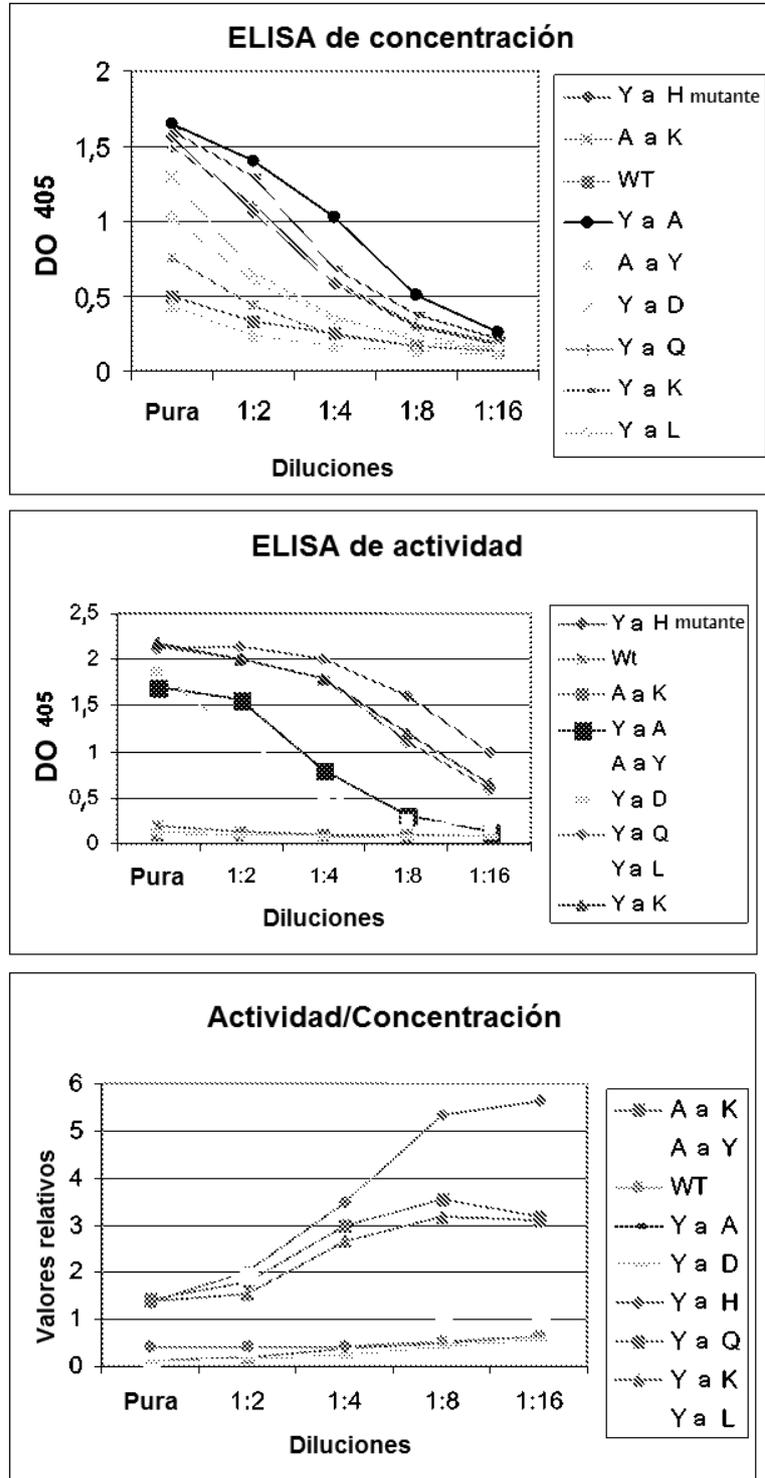


Figura 6

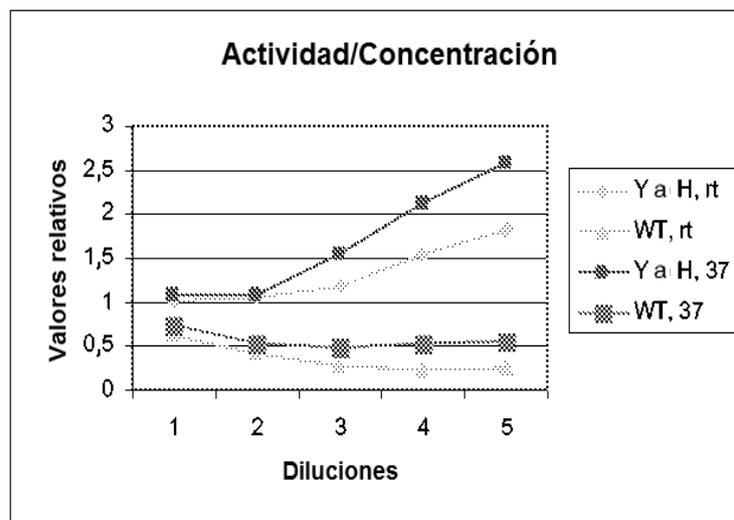
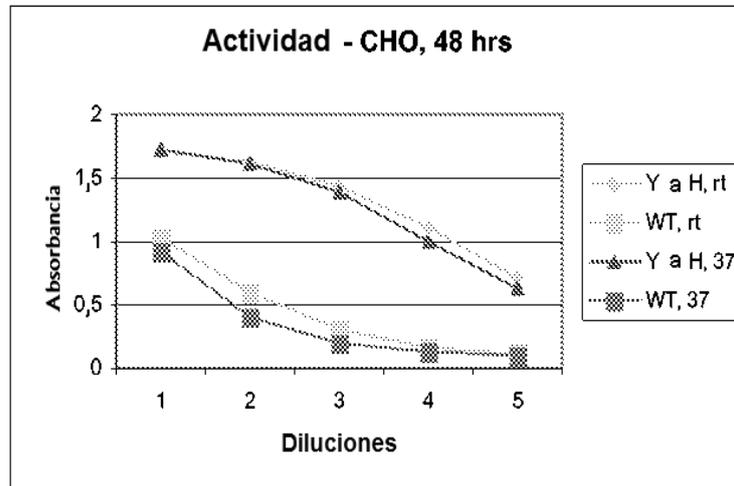
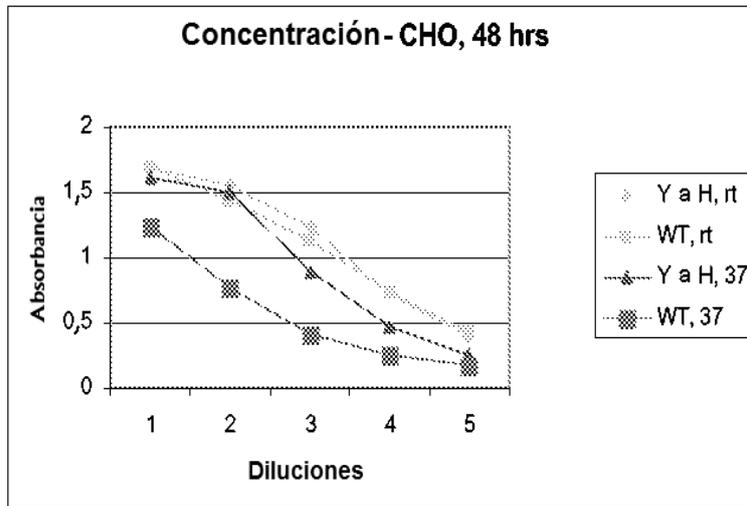


Figura 7

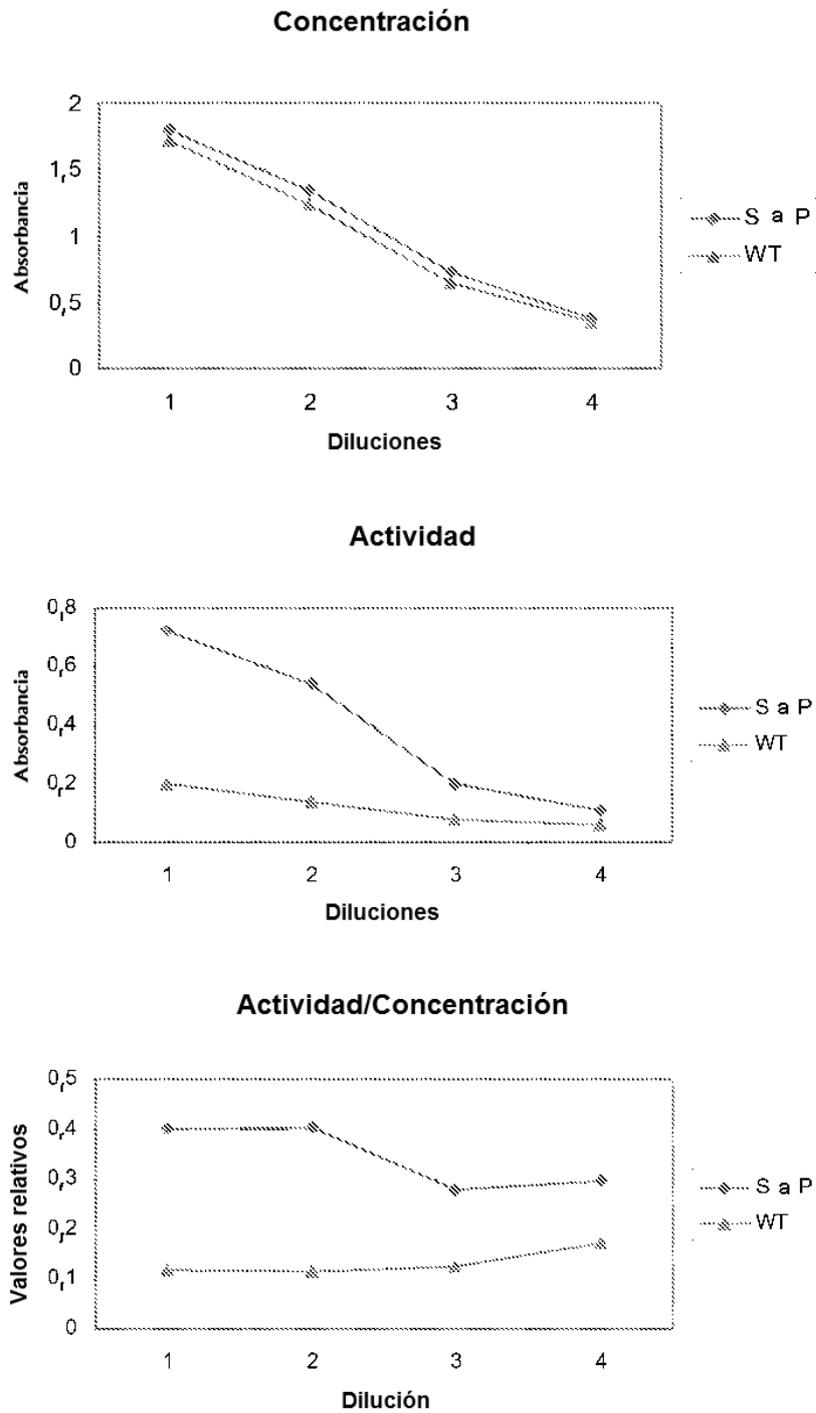


Figura 8

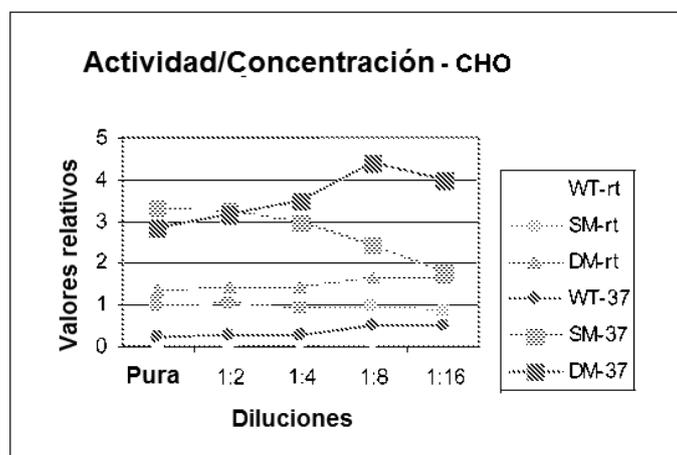
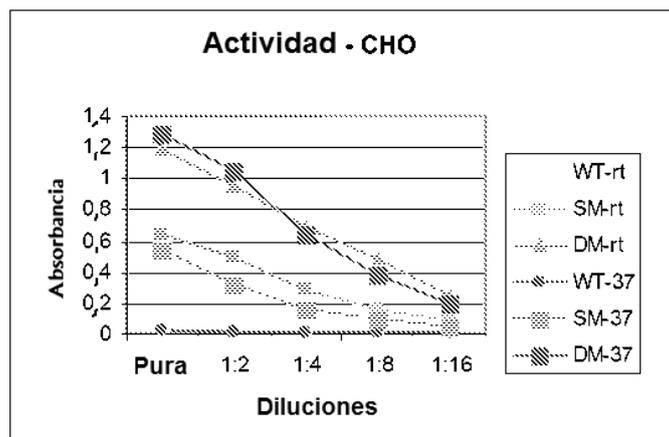
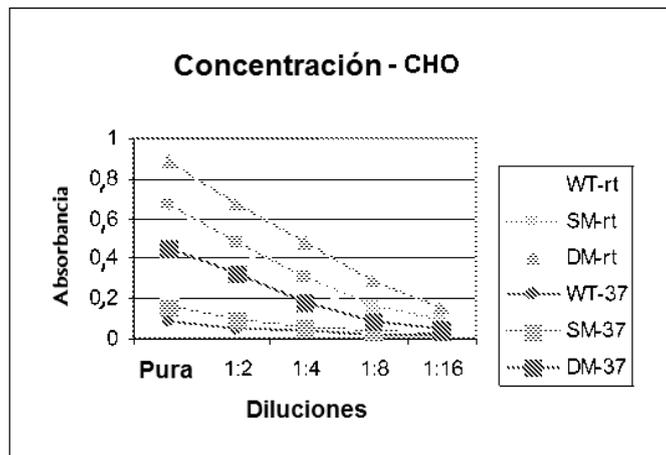


Figura 9

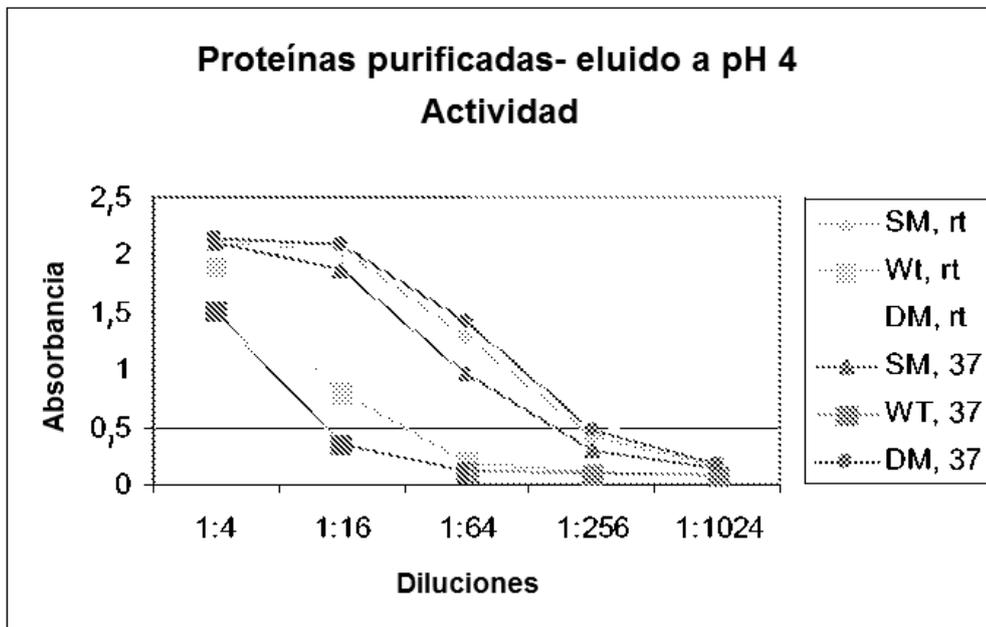
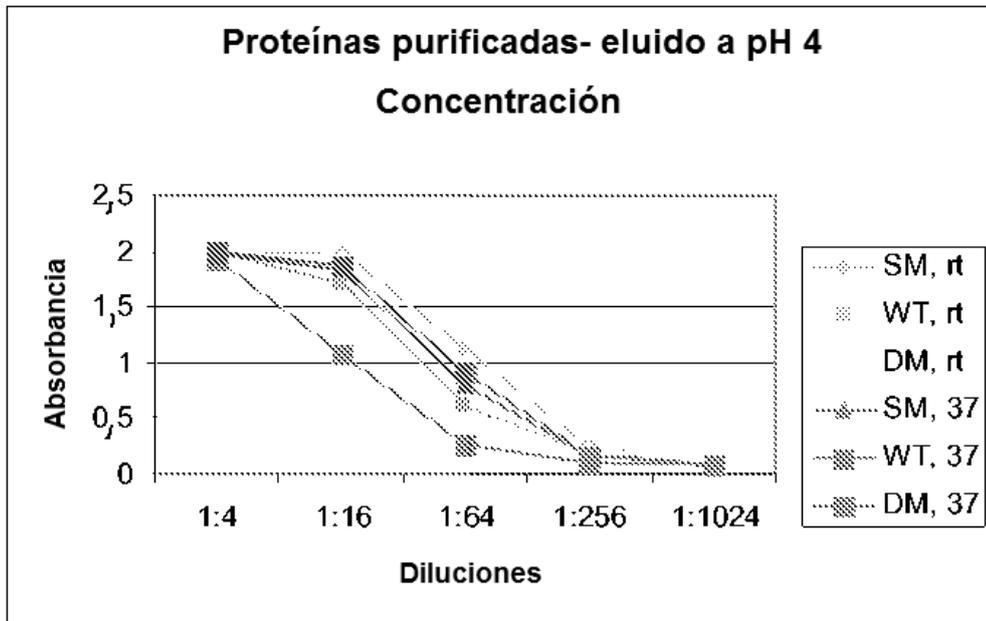


Figura 10A

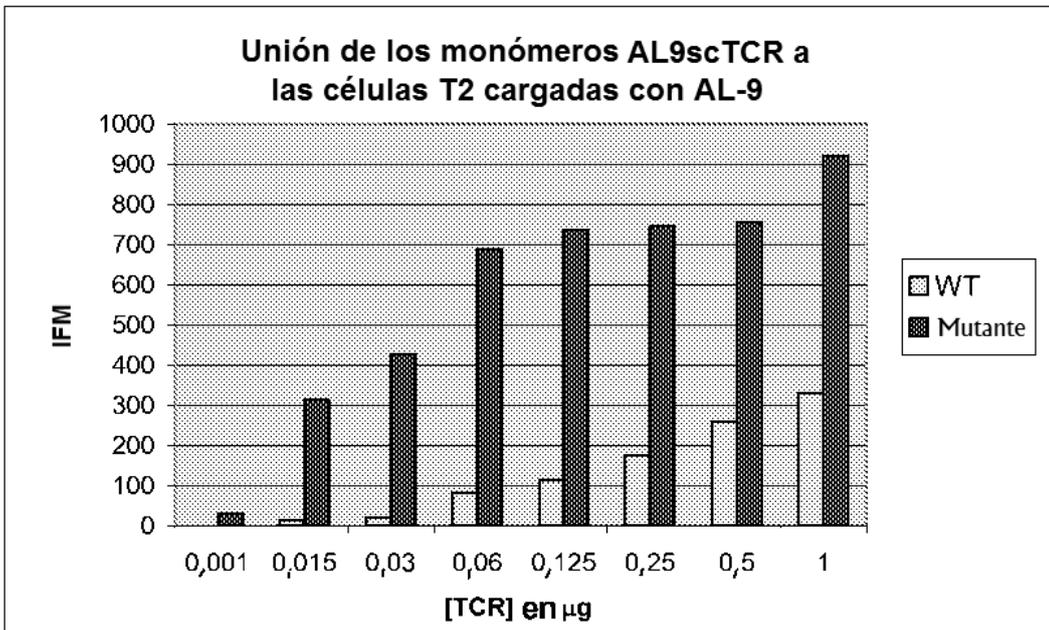
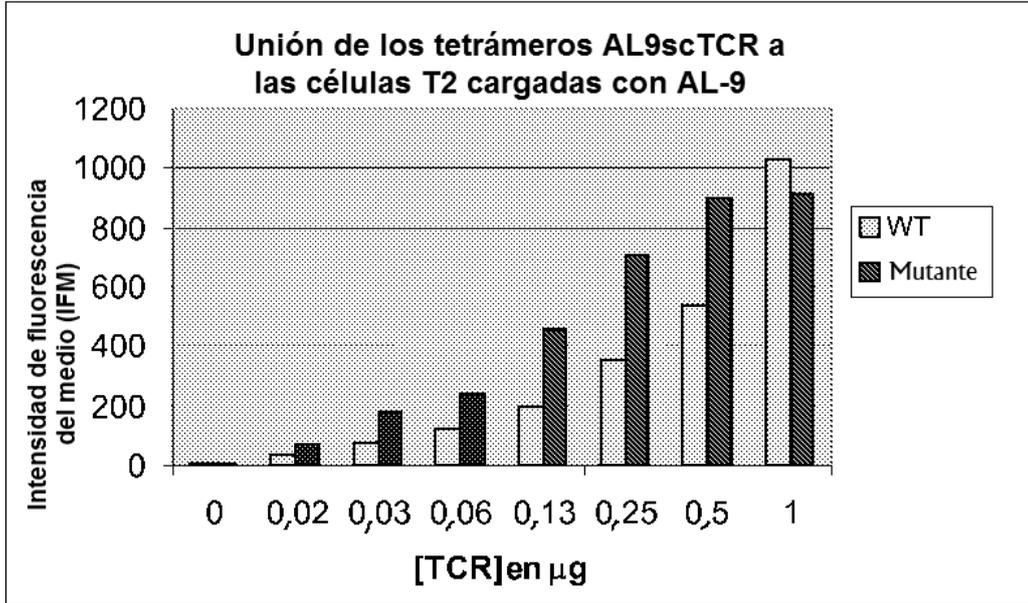


Figura 10B.

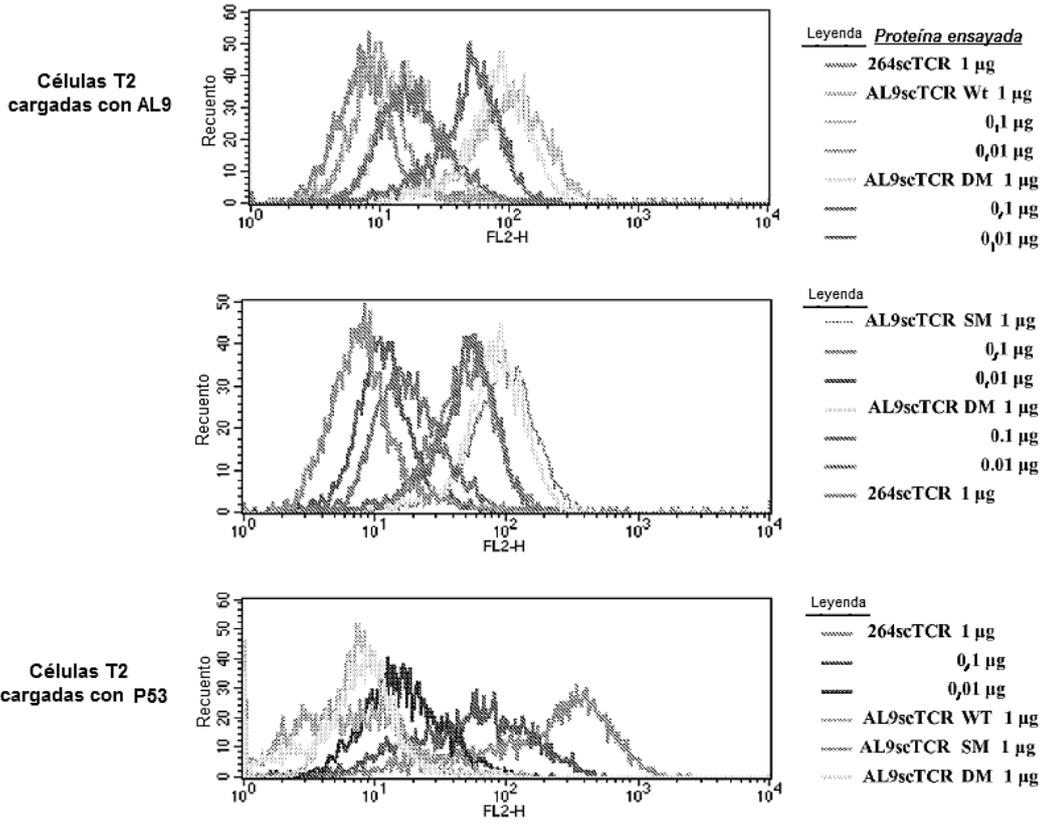
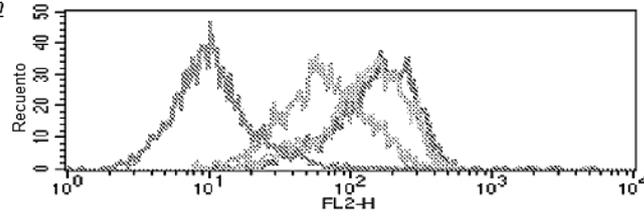


Figura 10C.

Células cargadas con péptido ensayadas

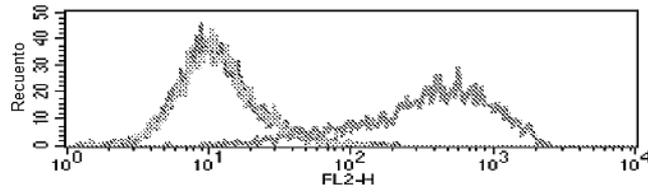
T2: AL9



Leyenda *Proteína ensayada*

- AL9scTCR WT
- AL9scTCR SM
- .-.-.- AL9scTCR DM
- 264scTCR

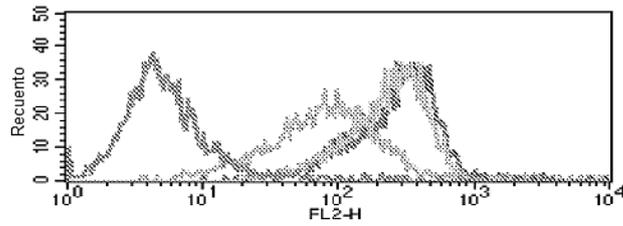
T2: p53



Leyenda

- AL9scTCR WT
- AL9scTCR SM
- .-.-.- AL9scTCR DM
- 264scTCR

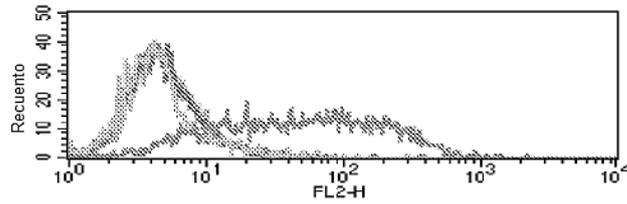
B: AL9



Leyenda

- AL9scTCR WT
- AL9scTCR SM
- .-.-.- AL9scTCR DM
- 264scTCR

B: p53



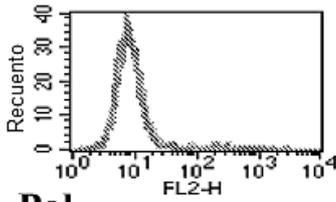
Leyenda

- AL9scTCR WT
- AL9scTCR SM
- .-.-.- AL9scTCR DM
- 264scTCR

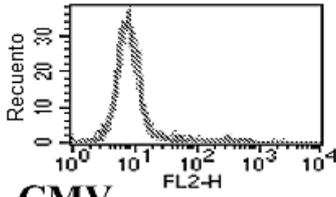
Figura 10D.

Péptidos ensayados en células presentadoras de antígeno

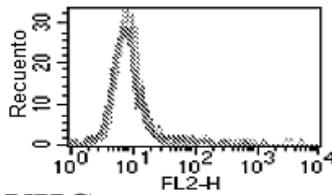
péptido Gag p17



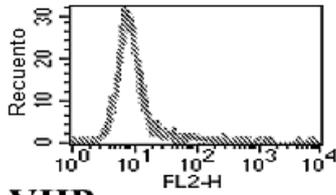
Pol



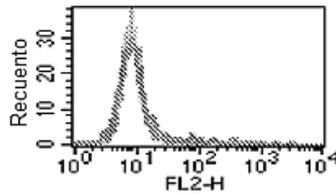
CMV



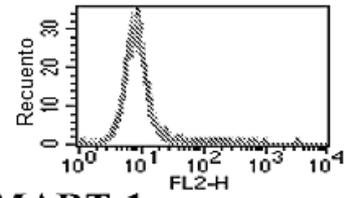
VHC core



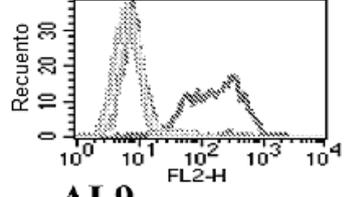
VHB env



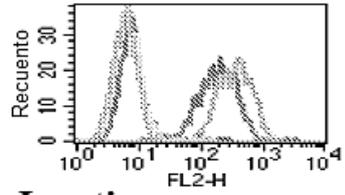
p53 264-272



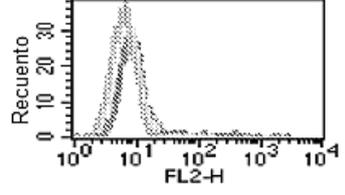
MART-1



AL9



Inactivo



Leyenda *Proteínas ensayadas*

- AL9scTCR Wt.
- AL9scTCR SM
- MART-1scTCR
- SA-PE
- Sin tinción

Figura 11

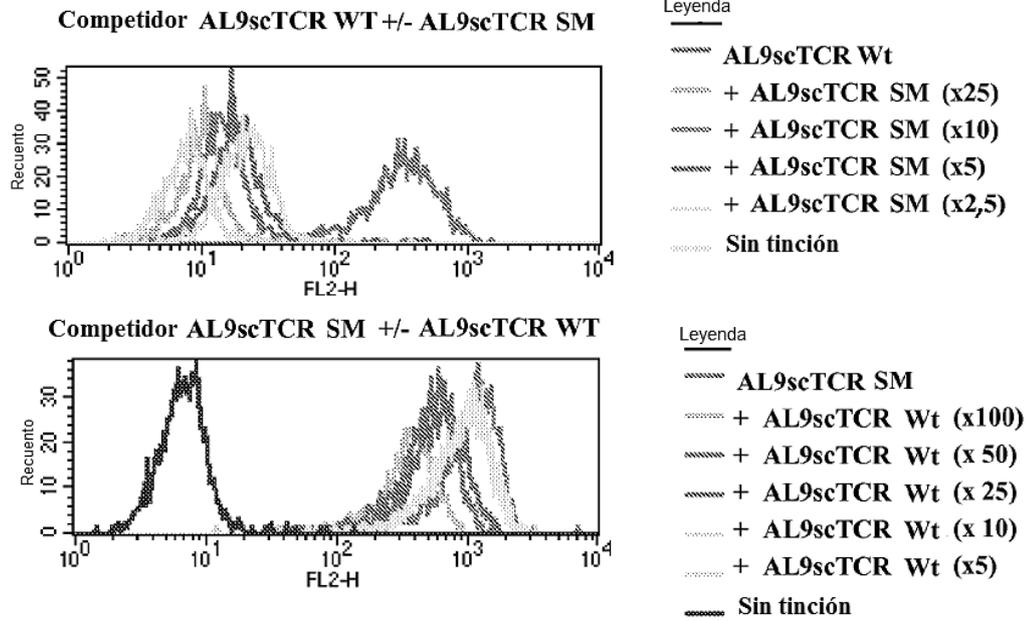


Figura 12.

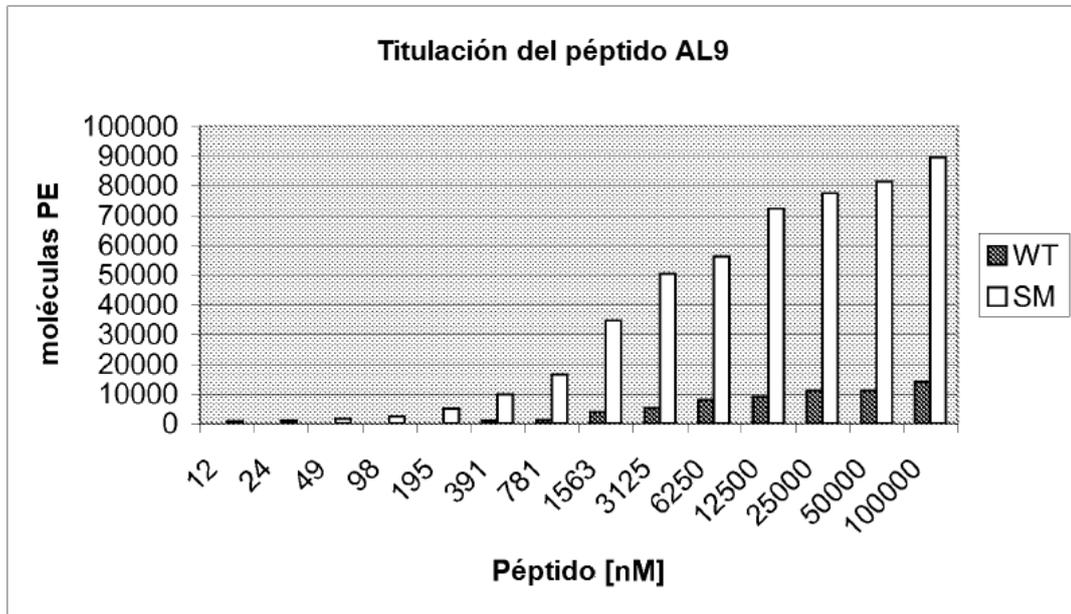


Figura 13

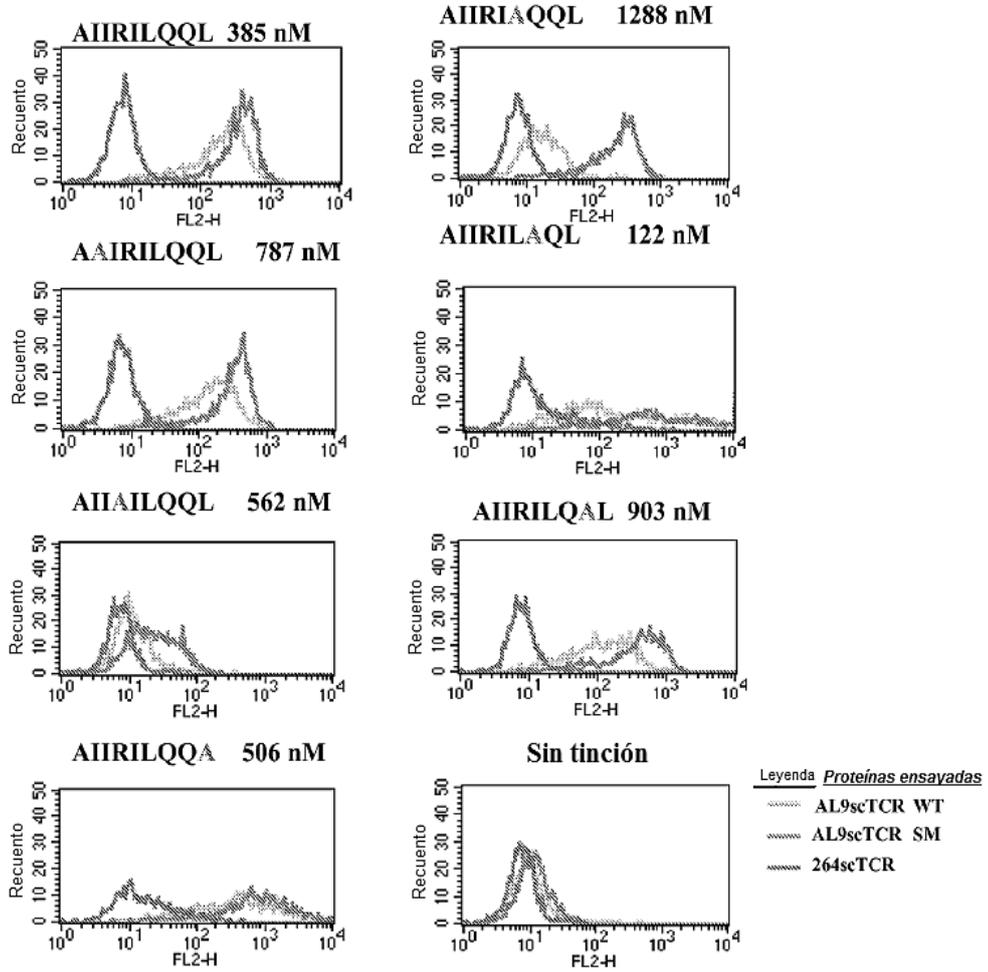


Figura 14A

Sujeto o parámetro	Aminoácidos en las posiciones:								
	59 (A) ^b	60 (I)	61 (E)	62 (R)	63 (I)	64 (L)	65 (Q)	66 (Q)	67 (L)
AC-01	A	I	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-03	A	I	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-07	A	I	E	R	M ^a	L	Q	Q	L
AC-09	A	I	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-26	A	I	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-29	A	I	E	R	T	L	Q	Q	L
AC-34	A	I	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-35	A	I	E	R	L	L	Q	Q	L
AC-41	A	I	E	R	T	L	Q	Q	L
AC-59	A	I	E	R	T	L	Q	Q	L
AC-64 ^c	A	L	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-13 ^d	A	L	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-60 ^e	A	L	E	R	I	L	Q	Q	L
AC-75 ^f	A	L	E	R	I	L	Q	Q	L
% Conservación ^g	98,6	81,9	96,4	97,8	77,6	100	99,3	100	97,8

^a Individuo que desarrolló una respuesta de linfocitos T CD8+ dirigida contra el epítipo Vpr₅₉₋₆₇

^b Las letras entre paréntesis representan los aminoácidos en la secuencia consenso del clado B del VIH-1 2002 (<http://hiv-web.lanl.gov>).

^c El porcentaje de conservación se calculó alineando el epítipo Vpr₅₉₋₆₇ con la secuencia del clado B del VIH-1 publicada (<http://hiv-web.lanl.gov>).

^d Las secuencias de 16 clones de individuos demostraron una población virica mixta de las secuencias ALIRILQQL (n = 10) y AHRILQQL (n = 6) (las diferencias están subrayadas)

^e Las letras en negrita representan aminoácidos que se diferencian de la secuencia consenso del clado B del VIH-1

Figura 14B

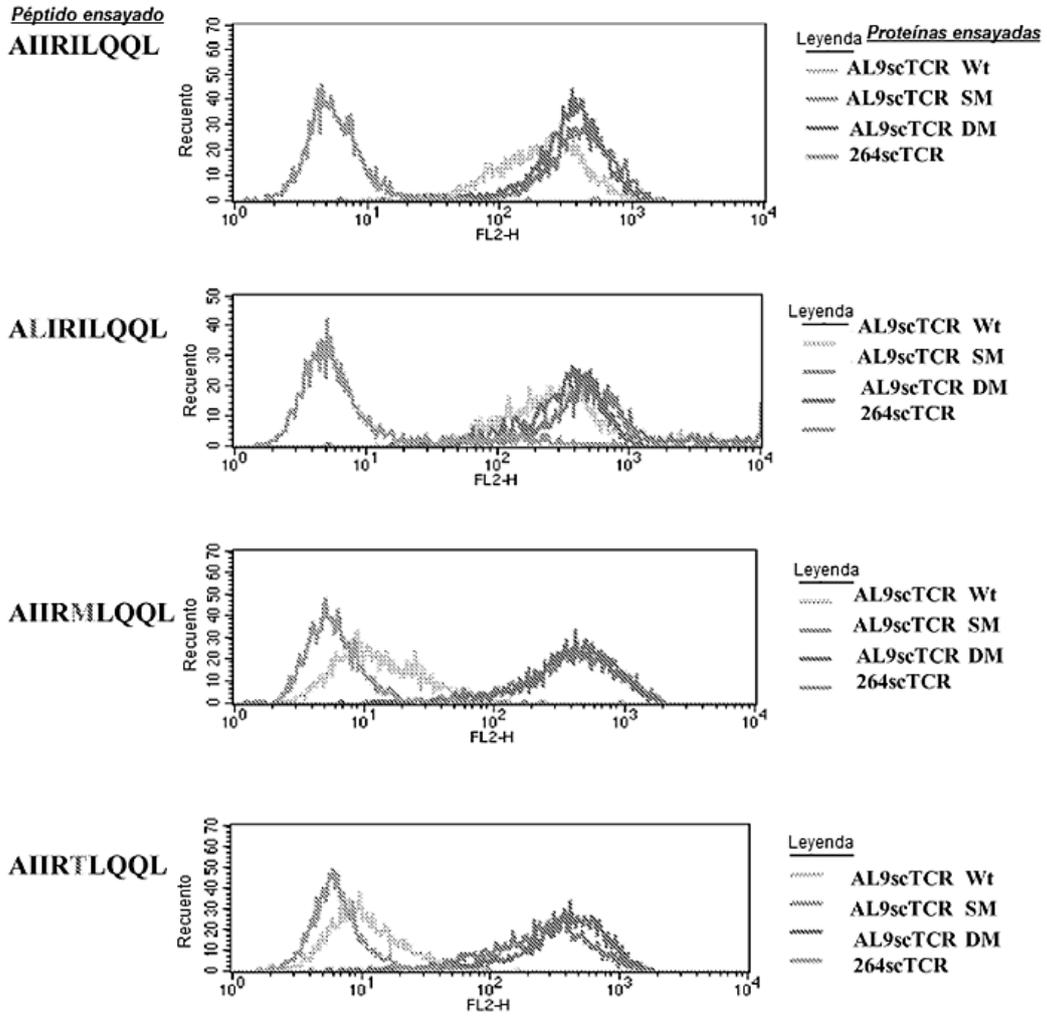


Figura 14B (cont.)

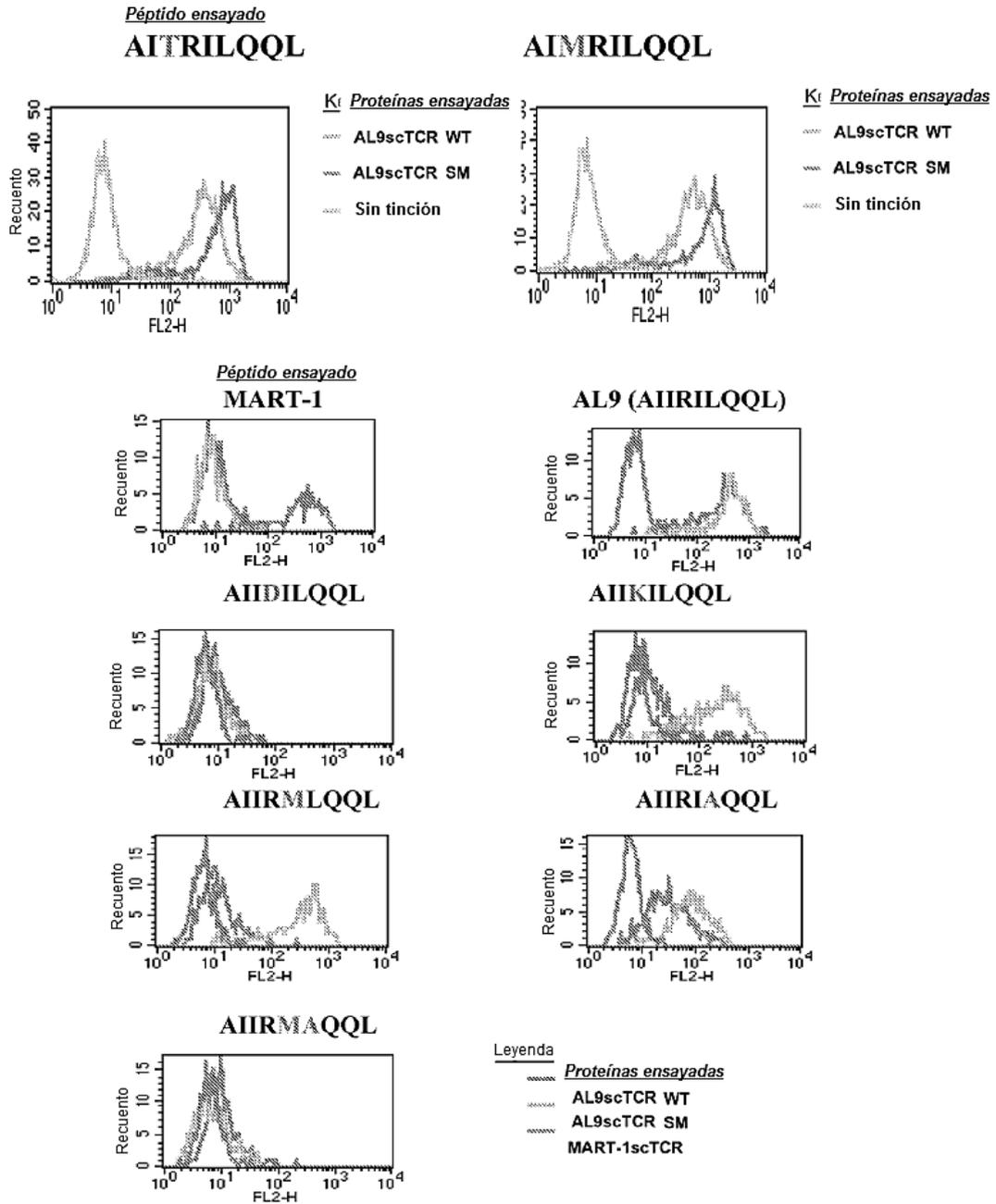


Figura 14B (cont.)

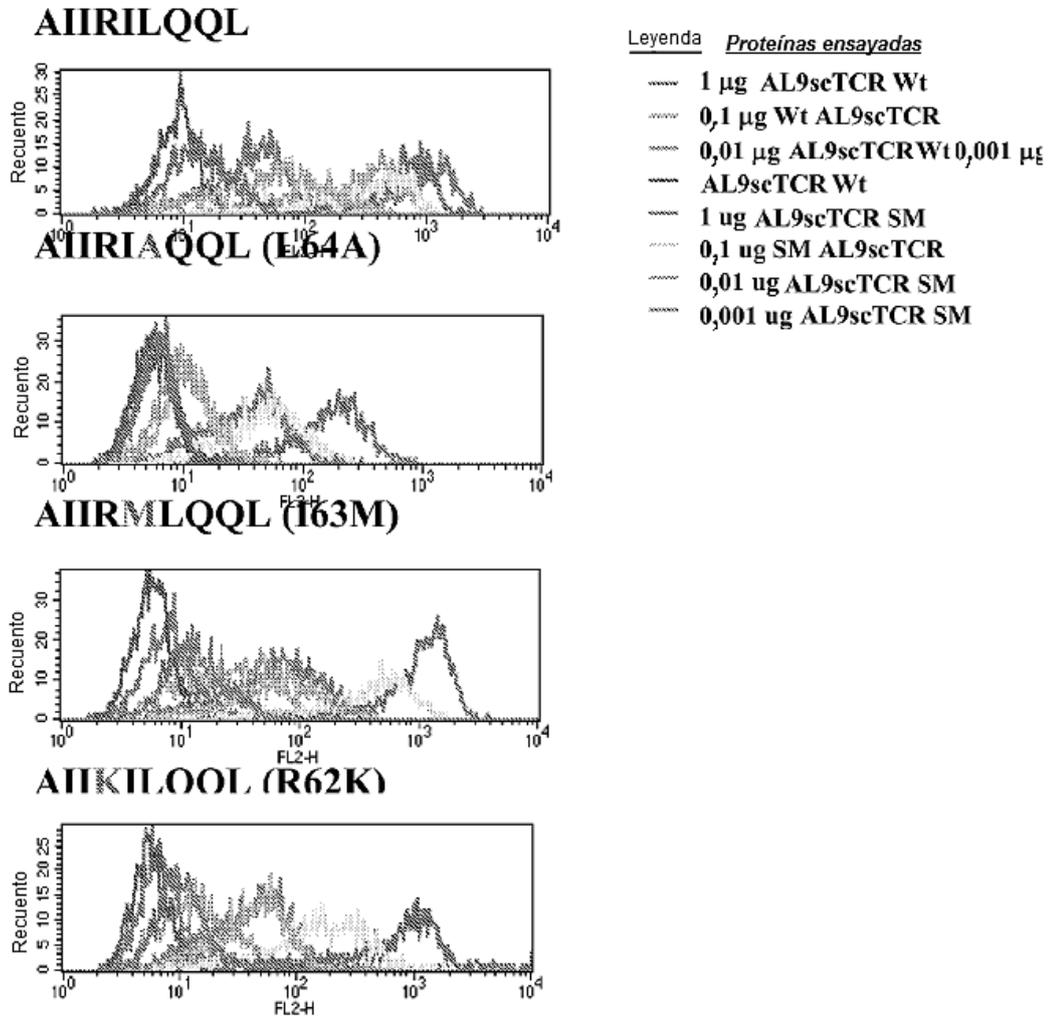


Figura 14C.

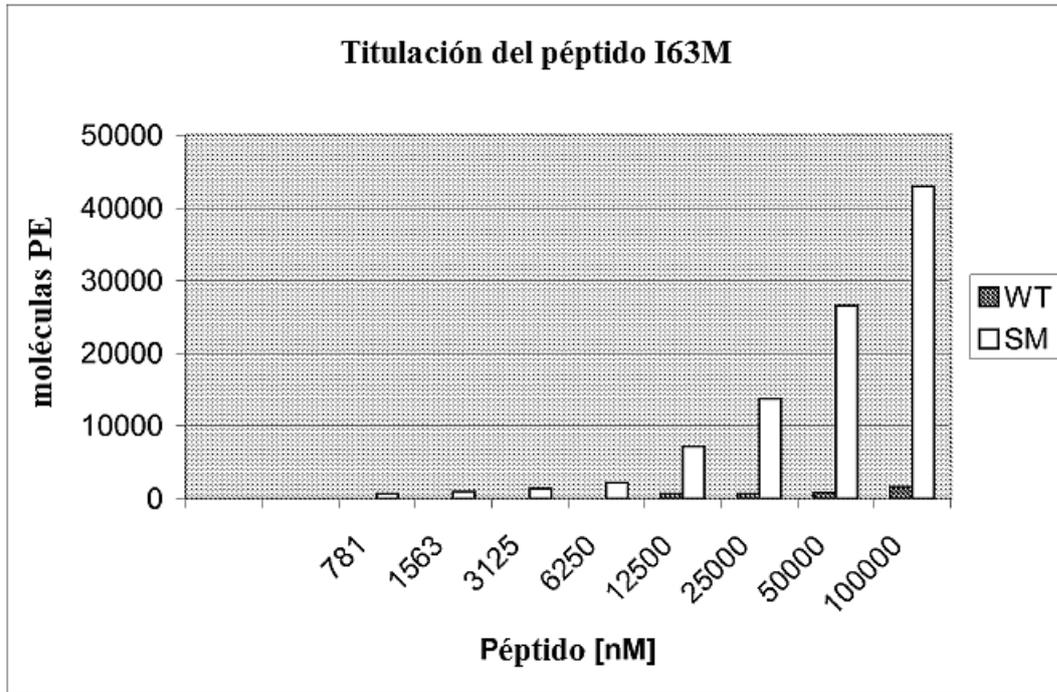


Figura 14D.

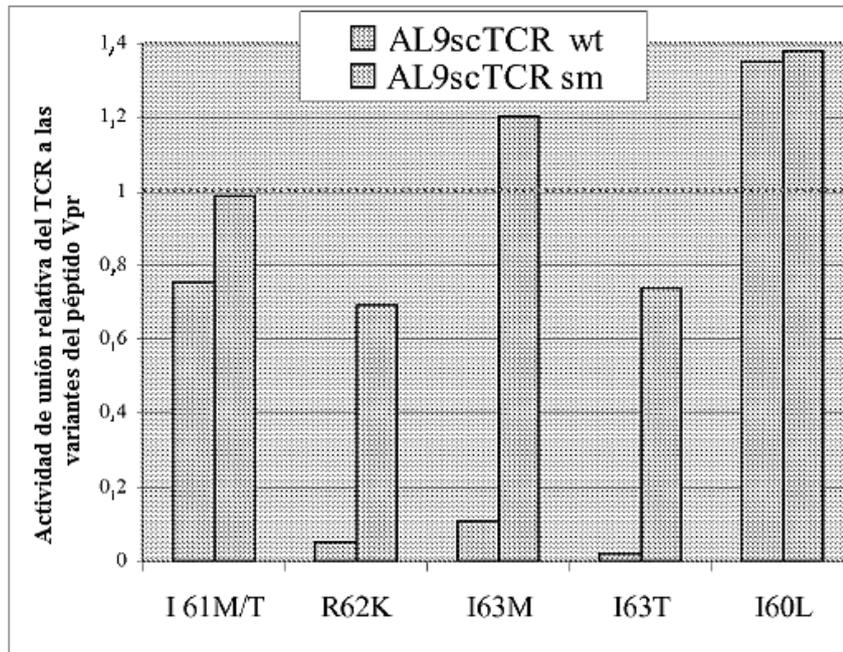


Figura 15.

donante HLA-A2+ LTNP

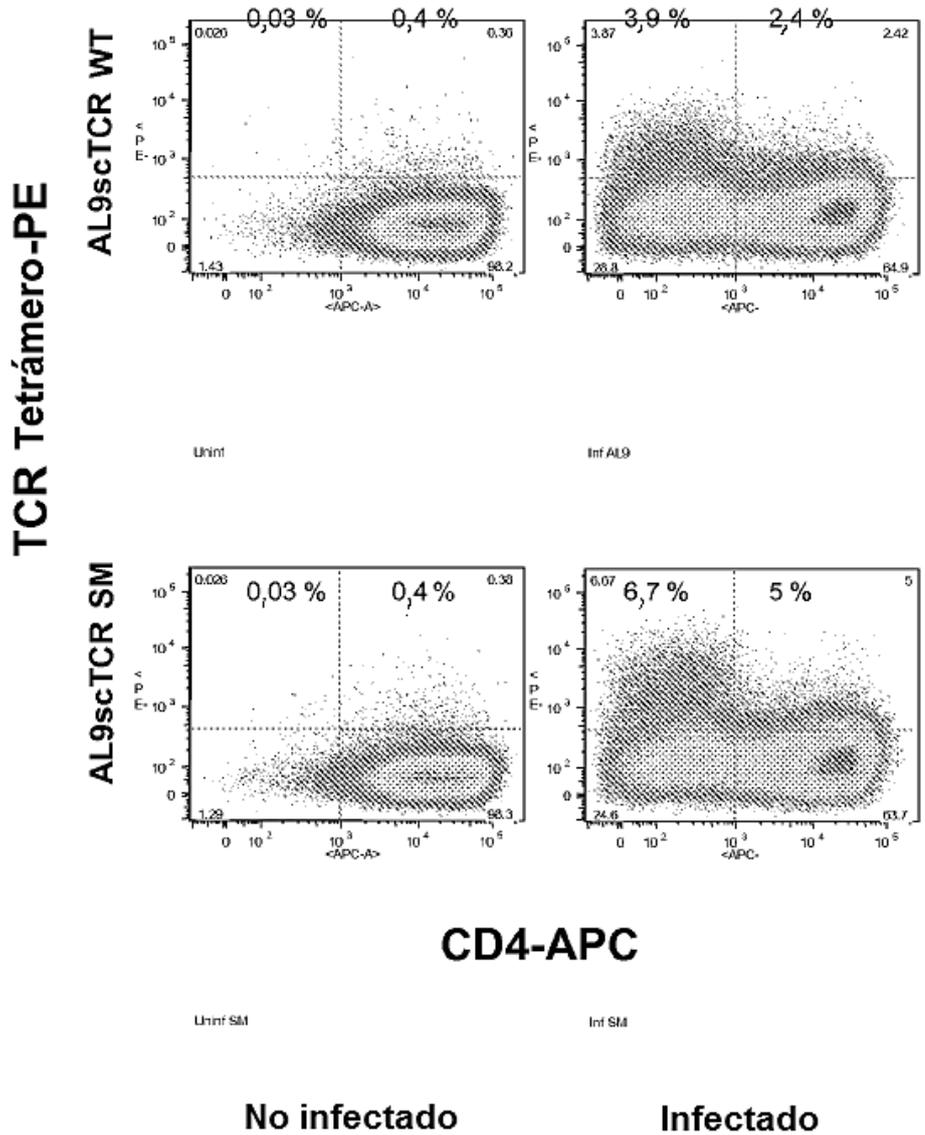


Figura 16A.

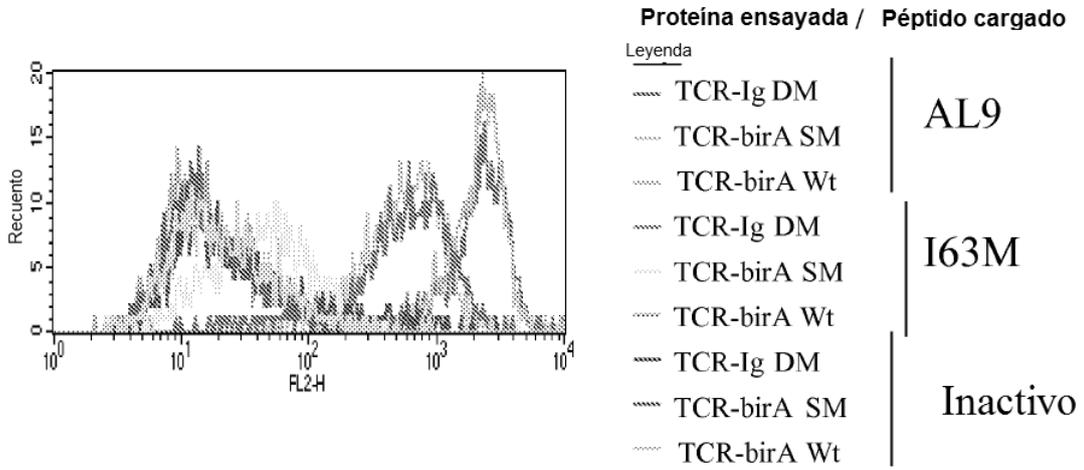


Figura 16B.

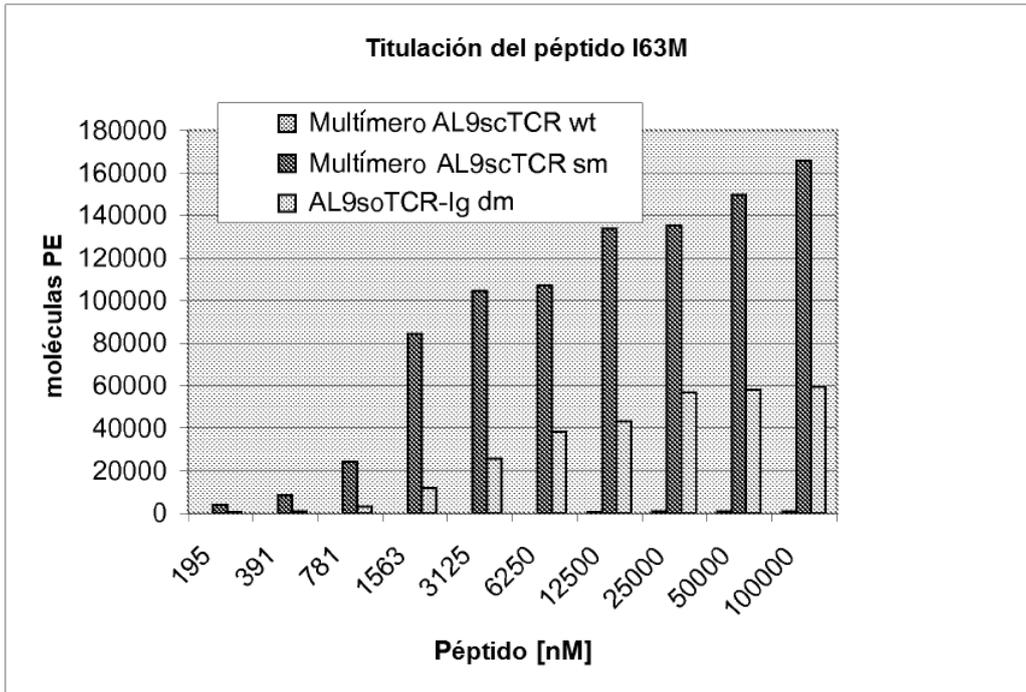


Figura 16C.

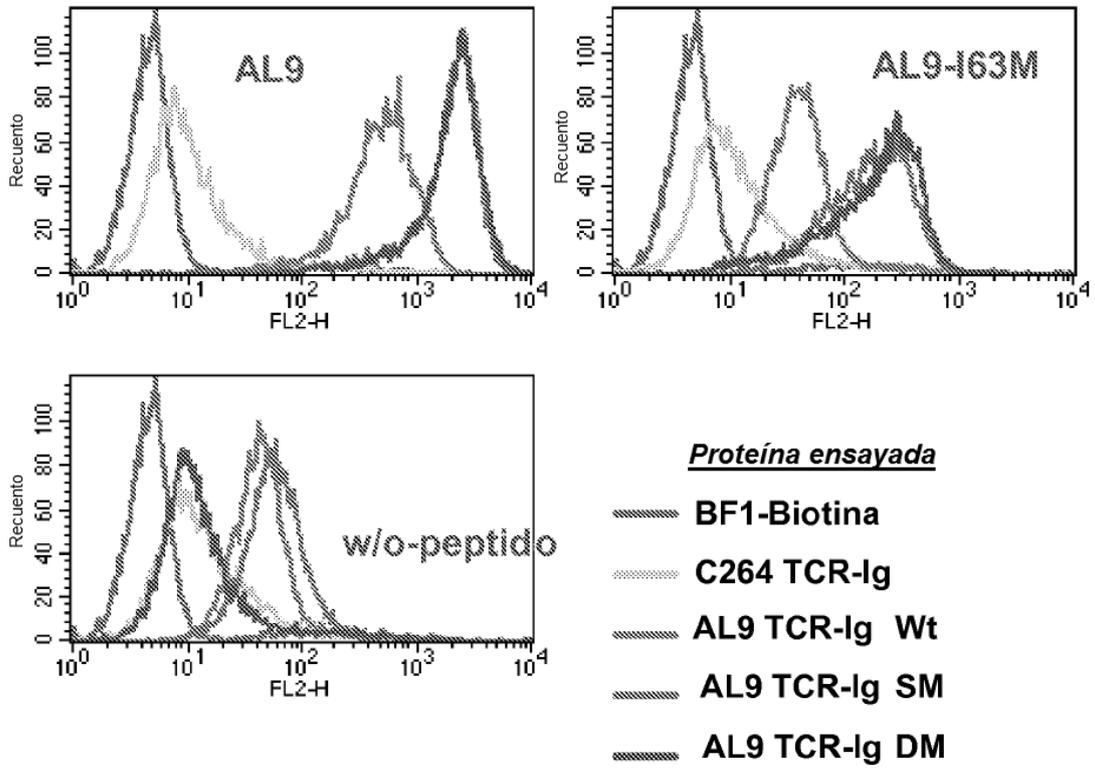


Figura 17B.

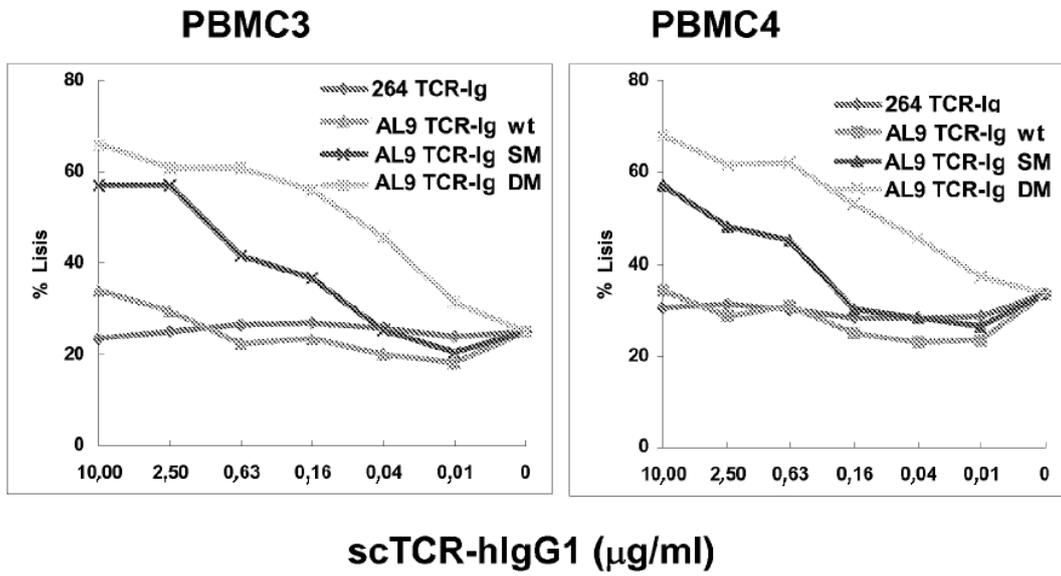


Figura 17A.

