

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 376**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/55** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2001 E 10182289 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2322228**

54 Título: **Proteínas de fusión del receptor de linfocitos T y conjugados y procedimientos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**05.06.2000 US 209536 P**

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

**15.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEIDANZ, JON, A;  
CARD, KIMBERLYN, F y  
WONG, HING, C**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 659 376 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**

Proteínas de fusión del receptor de linfocitos T y conjugados y procedimientos de uso de las mismas

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a complejos de receptor de linfocitos T solubles y más particularmente a complejos de fusión del receptor soluble de linfocitos T solubles y complejos conjugados de receptor de linfocitos T, así como procedimientos para fabricar y utilizar dichas moléculas. Las moléculas proporcionadas son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas así como para fines diagnósticos.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Las estrategias tradicionales para el tratamiento de enfermedades tales como cánceres, enfermedades autoinmunes, e infecciosas (que incluyen víricas, bacterianas, parasitarias, y fúngicas), han incluido la cirugía, radiación, quimioterapia, antibióticos o terapias de combinación. Sin embargo, dichas terapias no han probado su efectividad contra una mayoría de estas indicaciones. El desarrollo de remedios alternativos para prevenir y/o tratar enfermedades humanas es crucial. En años recientes, las estrategias de inmunoterapia y terapia genética que  
15 utilizando anticuerpo y linfocitos T han aparecido como nuevos y prometedores procedimientos para el tratamiento de enfermedades humanas.

- Uno de dichas estrategias de tratamiento ha incluido el uso de anticuerpos para el direccionamiento de agentes terapéuticos o diagnósticos a dianas particulares. Numerosos grupos han hecho desarrollos girando alrededor del uso de anticuerpos como un agente de direccionamiento. Dichos desarrollos han incluido la construcción de  
20 proteínas de fusión de anticuerpos y moléculas conjugadas de anticuerpo uniendo anticuerpos a distintas moléculas efectoras, incluyendo moléculas radioactivas, agentes quimioterápicos, toxinas y proteínas bioactivas adicionales. Los agentes terapéuticos o diagnósticos desarrollados utilizando dichas moléculas, se diseñan para que produzcan un efecto particular que es dirigido por el anticuerpo unido.

- De la misma manera que se han desarrollado anticuerpos como agentes terapéuticos, los efectores primarios adicionales del sistema inmunitario, los receptores de linfocitos T (TCR), tienen ventajas únicas como plataforma para el desarrollo de agentes terapéuticos. Mientras que los anticuerpos están limitados al reconocimiento de agentes patógenos en la sangre y espacios extracelulares o de proteínas diana en la superficie celular, los receptores de linfocitos T pueden reconocer antígenos presentados con moléculas de MHC en la superficie de las células (incluyendo antígenos derivados de proteínas intracelulares). Dependiendo del subtipo de linfocitos T que reconocen el antígeno presentado y se convierten en activados, los receptores de linfocitos T y linfocitos T que albergan receptores de linfocito T pueden participar en el control de distintas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, los linfocitos T están implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral mediante la inducción de la diferenciación de linfocitos B en células productoras de anticuerpos. Además, los linfocitos T activados actúan para iniciar respuestas inmunitarias mediadas por células. Por lo tanto, los receptores de linfocito T pueden reconocer dianas adicionales no disponibles para los anticuerpos.  
25  
30  
35

- Una respuesta de linfocito T se modula por la unión al antígeno con un receptor de linfocito T (TCR). Un tipo de TCR es un heterodímero unido a la membrana que consiste en una cadena  $\alpha$  y  $\beta$  que se parecen a la región variable (V) y constante C. La cadena  $\alpha$  de TCR incluyen una cadena V- $\alpha$  y C- $\alpha$  unidas covalentemente, mientras que la cadena  $\beta$  incluye una cadena V- $\beta$  unida covalentemente a una cadena C- $\beta$ . Las cadenas V- $\alpha$  y V- $\beta$  forman un bolsillo o fisura que se puede unir a un superantígeno o antígeno en el contexto de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (conocido en seres humanos como complejo HLA). Véase en general, Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3ª Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993).  
40

- El documento WO 00/23087 desvela moléculas de unión poliespecífica y particularmente moléculas de unión poliespecíficas de cadena sencilla que incluyen al menos un receptor de linfocito T de cadena sencilla (scTCR) unido covalentemente mediante una secuencia de engarce peptídico contra al menos un anticuerpo de cadena sencilla (scAb).  
45

- El documento WO 99/18129 desvela proteínas de fusión solubles que comprenden una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma unida covalentemente a un receptor de linfocito T de cadena sencilla en el que el receptor de linfocito T de cadena sencilla comprende una cadena V- $\alpha$  unida covalentemente a una cadena V- $\beta$  mediante una secuencia de engarce peptídico.  
50

- Se cree que el TCR tiene un papel importante en el desarrollo y función del sistema inmunitario. Por ejemplo, el TCR se ha informado que media la citotoxicidad, aumenta la proliferación de linfocitos B, y tiene un impacto en el desarrollo y gravedad de distintos trastornos que incluyen cáncer, alergias, infecciones víricas y trastornos autoinmunitarios.  
55

Por lo tanto, sería deseable proporcionar nuevos agentes de direccionamiento basados en receptores de linfocitos T, así como procedimientos para producir y utilizar dichos agentes para conjuntos terapéuticos y diagnósticos. Sería particularmente deseable proporcionar dichas moléculas que tendrían ciertas ventajas en comparación con los complejos de la técnica anterior basados en el direccionamiento de anticuerpos.

## 5 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un complejo de fusión del receptor de linfocito T soluble que comprenden un receptor de linfocito T y un polipéptido biológicamente activo conectado por un engarce peptídico, en el que el receptor de linfocito T consiste en el receptor de linfocito T de cadena sencilla 264 (scTCR264) y en el que el polipéptido biológicamente activo consiste en el dominio constante (Fc) de una IgG1 humana, en el que el receptor de linfocito T es específico para el reconocimiento de un antígeno peptídico que comprende una secuencia peptídica LLGRNSFEV.

Los TCR de la invención pueden modificarse en la manera que se une el TCR a la molécula biológicamente activa. La presente invención enseña el uso de las fusiones genéticas y la conjugación química como procedimientos para efectuar dicho enlace.

En algunos casos, las proteínas sc-TCR solubles incluirán uno o más efectores o marcadores fusionados. Por ejemplo, en algunos casos se pueden utilizar marcadores para ayudar a purificar el complejo de fusión proteico TCR de los componentes celulares de origen natural que acompañan normalmente la proteína de fusión. En otros casos, el marcador proteico se puede utilizar para introducir un producto químico pre-determinado o un sitio de escisión proteolítica en la proteína soluble. Particularmente, se contempla la introducción de un segmento que codifica un marcador en el ADN de un vector, por ejemplo, entre la secuencia que codifica el complejo de fusión y la cadena o fragmento adecuado de la molécula efectora de manera que se pueda escindir la molécula del TCR (es decir, se separe) de la cadena o fragmento del efector si se desea. Los complejos de fusión TCR y los complejos conjugados de TCR se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones que incluyen la detección y/o la creación de imágenes de células o tejido *in vivo*, así como los usos terapéuticos tales como el daño o destrucción de células *in vitro*. En general, las células o tejido dirigido incluirán uno o más ligandos capaces de la unión selectiva del TCR. Células ejemplares incluyen células tumorales tales como de melanoma y células infectadas por virus (por ejemplo, células infectadas con un virus ADN o ARN de primate tal como citomegalovirus o el virus del SIDA, respectivamente).

Otros aspectos y realizaciones de la invención se exponen posteriormente.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diseño de construcción y expresión de la proteína de fusión del receptor de linfocito T de cadena sencilla (sc) 264 soluble - cadena constante kappa (TCR-κ).

- A) Un esquema que representa el TCR 264 construido como un scTCR de tres dominios unido covalentemente a la región constante de la cadena kappa.
- B) Tinción de azul de Coomassie de un gel proteico que contiene la proteína de fusión 264 sc TCR-κ purificada ejecutada en condiciones reducidas y no reducidas.
- C) Inmunotransferencia de la proteína de fusión 264 sc TCR-κ hibridada con un conjugado anti-kappa marcador con peroxidasa de rábano rústico (HRP).

La Figura 2 representa el diseño y la expresión de la construcción de una proteína de fusión 264 scTCR-IL-2 soluble. (de referencia)

- A) Un esquema que muestra el gen scTCR 264 unido covalentemente al gen IL-2 con el marcador peptídico EE incluido para facilitar la detección de la molécula.
- B) Tinción con azul de Coomassie de un gel proteico que contenía proteínas de fusión 264 scTCR-IL-2 y 264 sc TCR-κ.
- C) Análisis de inmunotransferencia de la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2 hibridada con un mAb anti-EE y un conjugado de cabra anti-ratón-HRP.

La Figura 3 son los resultados demostrativos de la actividad de IL-2 en un bioensayo.

La Figura 4 son los resultados demostrativos de una célula presentadora de antígenos teñida con la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2. (de referencia)

La Figura 5 son los resultados demostrativos de un ensayo de conjugación celular.

La Figura 6 es un esquema de los formatos del receptor de linfocitos T basándose en los agentes terapéuticos.

La Figura 7 es un esquema de la destrucción celular tumoral mediada por suministro de fármacos dirigido por scTCR.

La Figura 8 es un esquema de la destrucción celular tumoral mediada por citotoxicidad mediada por células dependiente de Fc.

La Figura 9 es una ilustración esquemática del vector pNAG2.

La Figura 10 es un dibujo esquemático que muestra el vector pSUN27.

La Figura 11 es un dibujo que muestra las moléculas híbridas biespecíficas pBISP/D011.10 y pBISP/149.

La Figura 12A es un dibujo esquemático que muestra un procedimiento para fabricar

una molécula de anticuerpo biespecífico quimérico. El procedimiento utiliza una célula que expresa un hibridoma (hibridoma 145-2C11) para producir cadenas de anticuerpo (de línea pesada) que se combinan con una molécula de fusión sc-TCR/Ig (cadena ligera) dentro de la célula. Una estructura preferida de la molécula sc-TCR/Ig se ilustra en la Figura 12B.

La Figura 13 es un dibujo esquemático que muestra el vector pSUNT7.

### **Descripción detallada de la invención**

En un intento para mejorar la actuación de moléculas basadas en anticuerpo, los inventores desarrollaron agentes terapéuticos específicos de antígeno basados en el uso de los receptores de linfocitos T (TCR). Los reactivos basados en TCR tendrían varias ventajas sobre las moléculas de anticuerpo. Primero, las terapias basadas en anticuerpo se asocian a menudo con menor eficacia de destrucción de la esperada de las células tumorales debido a la dispersión de los antígenos tumorales. Aunque hay informes de la dispersión del MHC, los niveles de péptidos MHC/tumorales específicos en la circulación son mucho más bajos que el antígeno tumoral circulante. Segundo, las moléculas de anticuerpo no reconocen muchos antígenos tumorales potenciales debido a que no están expuestos en la superficie de las células o no son accesibles para la molécula de anticuerpo. Muchas potenciales proteínas específicas del tumor son intracelulares pero se procesan normalmente en la célula en péptidos que entonces se presentan en el contexto de moléculas del MHC clase I o del MHC clase II en la superficie de la célula tumoral. A diferencia de los TCR, los anticuerpos no reconocen en general estos antígenos procesados que ocupan las grietas de unión de las moléculas del MHC. Tercero, muchos de los antígenos reconocidos por los anticuerpos son heterogéneos por naturaleza, lo que limita la eficacia de un anticuerpo a una única histología tumoral. Por el contrario, muchos epítomos de linfocito T son comunes a un amplio intervalo de tumores que se originan de varios tejidos distintos.

Como se ha resumido anteriormente, la presente invención se refiere a un complejo de fusión de receptor de linfocito T soluble que comprende un receptor de linfocito T y un polipéptido biológicamente activo conectado por un engarce peptídico, en el que el receptor de linfocitos T consiste en el receptor 264 de linfocitos T de cadena sencilla (scTCR264) y en el que el polipéptido biológicamente activo consiste en el dominio constante (Fc) de una IgG1 humana, en el que el receptor de linfocito T es específico para el reconocimiento de un antígeno peptídico que comprende una secuencia peptídica LLGRNSFEV así como a un procedimiento de preparación de un complejo de fusión de receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una cadena de receptor de linfocito T, o subfragmento de la misma; proporcionar un polipéptido biológicamente activo que se corresponde con una segunda cadena, o subfragmento de la misma; conectar la cadena de receptor de linfocito T y la segunda cadena a un engarce peptídico; y recuperar el complejo polipeptídico de fusión del receptor de linfocito T unido, generando de esta manera un complejo de fusión de receptor de linfocito T así como un procedimiento *in vitro* para destruir una célula diana que comprende un ligando capaz de unirse específicamente a un receptor de linfocito T, comprendiendo el procedimiento: a) poner en contacto las células diana con un complejo de fusión de receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1 o 2, b) formar un complejo de unión específico entre el ligando de las células diana, el complejo de fusión del receptor de linfocito T y las células efectoras que reconocen el polipéptido biológicamente activo, y c) destruir las células diana con las células efectoras.

Un linfocito T reconoce el antígeno presentado sobre las superficies de las células por medio de los receptores de linfocito T expresado en su superficie celular. Los TCR son heterodímeros unidos por disulfuros, la mayoría consisten en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de glicoproteína. Los linfocitos T utilizan mecanismos para generar diversidad en sus moléculas de receptor similar a los mecanismos para generar la diversidad de anticuerpos que se opera en los linfocitos B (Janeway y Travers; Immunobiology 1997). De manera similar a los genes de inmunoglobulinas, los genes de TCR están compuestos de segmentos que se recolocan durante el desarrollo de las células T. Los TCR polipeptídicos consisten en regiones variables terminales y constantes carboxilo terminales. Aunque las funciones de la región terminal carboxilo funciona como un ancla transmembrana y participa en la señalización intracelular cuando el receptor está ocupado, la región variable es responsable del reconocimiento de antígenos. La cadena  $\alpha$  de TCR contiene regiones variables codificadas solo por los segmentos V y D, mientras que la cadena  $\beta$  contiene segmentos de unión (J) adicionales. El reordenamiento de estos segmentos y la mutación y maduración de las regiones variables da como resultado un repertorio de TCR diverso capaz de reconocer un número increíblemente grande de antígenos diferentes presentados en el contexto de diferentes moléculas de TCR.

Se ha desarrollado previamente una tecnología para producir receptores de linfocitos T (TCR) altamente específicos que reconocen antígenos particulares. Por ejemplo, las solicitudes de patente de EE. UU. en trámite U.S.S.N. 08/813,781 y U.S.S.N. 09/422,375 y las publicaciones internacionales PCT/US98/04274 y PCT/US99/24645, y las referencias expuestas en las mismas desvelan procedimientos de preparación y utilización de TCR específicos. Adicionalmente, se han producidos TCR específicos particulares por procedimiento solubles como TCR de cadena sencilla, solubles (scTCR). Se han desvelado procedimientos para la producción y uso de scTCR y se han descrito en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite 08/943.086, y en la solicitud internacional PCT/US98/20263. Dichos TCR y scTCR se pueden alterar de manera que se crean fusiones o conjugados que resultan en TCR y scTCR útiles como agentes terapéuticos. Los complejos de TCR de la invención se pueden generar fusionando genéticamente la

región codificante del TCR o scTCR producida recombinantemente con los genes que codifican proteínas biológicamente activas para producir complejos de fusión de TCR. De manera alternativa, un TCR o scTCR también se pueden conjugar químicamente con moléculas biológicamente activas para producir complejos conjugados de TCR.

5 La expresión "molécula de fusión" como se utiliza en el presente documento significa una molécula de TCR y una molécula efectora habitualmente una proteína o secuencia peptídica unida covalentemente (es decir, fusionada) por un procedimiento recombinante, químico u otro adecuado. Si se desea, la molécula de fusión se puede fusionar en uno o varios sitios mediante una secuencia de engarce peptídico. De manera alternativa el engarce peptídico se puede utilizar para ayudar a la construcción de la molécula de fusión. Las moléculas de fusión específicamente  
10 preferidas son las proteínas de fusión.

Un "polipéptido" se refiere a cualquier polímero que preferentemente consiste esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos naturales independientemente de su tamaño. Aunque el término "proteína" se utiliza a menudo en referencia a proteínas relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a pequeños polipéptidos, el uso de estos términos en el campo a menudo se solapa. El término "polipéptido" se refiere generalmente a  
15 proteínas, polipéptidos y péptidos a menos de que se señale otra cosa. Los péptidos útiles de acuerdo con la presente invención en general tendrán generalmente entre aproximadamente 0,1 a 100 kD o más hasta aproximadamente 1000 kD, preferentemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, y 50 kD según se juzga por técnicas de medición del tamaño de moléculas convencionales tales como centrifugación o SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida.

20 La expresión "molécula conjugada" como se utiliza en el presente documento significa una molécula de TCR y una molécula efectora habitualmente una molécula química o sintetizada unida covalentemente (es decir, fusionada) por un procedimiento químico u otro adecuado. Si se desea, la molécula conjugada se puede fusionar en uno o varios sitios mediante una secuencia de engarce peptídico o una molécula de vehículo. De manera alternativa, el engarce peptídico o vehículo se puede utilizar para ayudar en la construcción de la molécula conjugada. Moléculas específicamente preferidas son las toxinas o marcadores detectables conjugados.  
25

El TCR de fusión y complejos de TCR conjugado de la invención comprende una molécula biológicamente activa o efectora (términos que se van a utilizar en el presente documento de manera intercambiable) unida covalentemente a la molécula de TCR como se ha definido anteriormente. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula biológicamente activa" o "molécula efectora" significa una secuencia de aminoácidos tal como una  
30 proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o glicolípido, glicoproteína, lipoproteína o agente químico que puede producir los efectos deseados como se expone en el presente documento. También se contemplan los ácidos nucleicos de molécula efectora que codifican una proteína, polipéptido o péptido biológicamente activos o efectores. Por lo tanto, las moléculas adecuadas incluyen factores reguladores, enzimas, anticuerpos, o fármacos así como ADN, ARN, y oligonucleótidos. La molécula biológicamente activa o efectora  
35 puede ser de origen natural o se puede sintetizar a partir de componentes conocidos, por ejemplo, por síntesis recombinante o química y puede incluir componentes heterólogos. Una molécula biológicamente activa o efectora tiene en general entre aproximadamente 0,1 a 100 kD o más hasta aproximadamente 1000 kD, preferentemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, y 50 kD según se juzga por técnicas de medición del tamaño de moléculas convencionales tales como centrifugación o SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. Los efectos deseados de la invención incluyen, por ejemplo, los que inducen la proliferación celular o la muerte celular, inician una respuesta inmunitaria o actúan como una molécula de detección con fines diagnósticos como se determina por los ensayos desvelados posteriormente, incluyendo un ensayo que incluye las etapas secuenciales de cultivar las células para proliferar las mismas, y poner en contacto las células con un complejo de fusión de TCR de la invención y después evaluar si el complejo de fusión de TCR inhibe posteriormente el desarrollo de las células.  
40

45 Adicionalmente, la molécula efectora puede ser una molécula marcada detectablemente adecuada para el diagnóstico o estudios de creación de imágenes tales como un marcador fluorescente tal como una proteína fluorescente verde, ficoeritrina, cichomo, o rojo Texas; o un radionúclido, por ejemplo, yodo-131, itrio-90, renio-188 o bismuto-212. Véase, por ejemplo, Moskaug, y col. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989); Pastan, I. y col. Cell 47, 641, 1986; Pastan y col., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes y Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982); Solicitud PCT publicada n° WO 94/29350; Solicitud PCT publicada n° WO 94/04689; y Pat. de EE. UU. 5.620.939 para una divulgación relativa a la fabricación y uso de proteínas que comprenden efectores o marcadores.  
50

Un TCR de fusión o complejo conjugado que incluye una molécula efectora unida covalentemente tiene varios usos importantes. Por ejemplo, el TCR de fusión o complejo conjugado se puede emplear para suministrar la molécula efectora a ciertas células capaces de unirse específicamente al TCR. En consecuencia el TCR de fusión o complejo conjugado proporciona medios para dañar o destruir selectivamente células que comprenden el ligando. Ejemplos de células o tejidos capaces de dañarse o destruirse por el TCR de fusión o complejos conjugados incluyen células tumorales e infectadas con virus o bacterias que expresen uno o más ligandos capaces de unirse específicamente al TCR. Las células o tejidos susceptibles de ser dañados o destruidas se pueden ensayar fácilmente por los procedimientos que se desvelan en el presente documento.  
55  
60

Un ejemplo específico de complejo de fusión del TCR fusionado a una molécula efectora es la siguiente: un sc-TCR tal como el sc-TCR p264 que se desvela posteriormente en el Ejemplo 5 posterior se puede producir transfectando célula de mamífero con el vector 254 ADN que se ilustra en la Fig. 1. El complejo de fusión proteína p264 sc-TCR reconoce un fragmento peptídico procesado de la proteína supresora tumoral p53 de tipo silvestre humana presentada en el contexto del antígeno HLA humano; HLA-2.1. El sc-TCR p264 y su engarce peptídico han sido descritos en Theobald, M.J., y col., PNAS (USA) (1995), 92:11993. La secuencia peptídica es LLGRNSFEV. La expresión de la proteína supresora tumoral p53, está regulada positivamente en células malignas. Se ha demostrado que un 50 % de todos los tumores expresan niveles aumentados de p53 en la superficie (Holliston, M.D., y col., Science (1991), 253:49). Por lo tanto, las moléculas scTCR específicas de este epítipo se podrían marcar con una toxina que se podría suministrar a las células malignas que expresen el ligando del fragmento del péptido p53 HLA 2.1. Esta inmunoterapia específica de diana podría ser eficaz destruyendo solo células malignas. Los procedimientos para la medición de la citotoxicidad *in vitro* son bien conocidos e incluyen los ensayos de viabilidad convencionales como se describe posteriormente.

Una molécula de sc-TCR que comprende p149 sc-TCR unido a un efector tiene otros usos importantes. Por ejemplo, la molécula sc-TCR se puede utilizar para destruir selectivamente células de cáncer de mama humano que expresan el péptido 264. Se pueden llevar a cabo estudios *in vitro* en los que se evalúe la capacidad de la molécula de toxina marcada 264 para destruir células de cáncer de mama utilizando un ensayo no radioactivo de célula citotóxica utilizando un ensayo de citotoxicidad por liberación de  $\text{Eu}^{3+}$  (Bouma, G.J., y col., (1992) Hum. Immunol. 35:85). Una molécula de sc-TCR que comprende una molécula efectora fusionada se pueden ensayar fácilmente *in vivo*. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo estudios *in vitro* injertando células de cáncer de mama que expresan p264/HLA.A21 en ratones transgénicos HLA/A2. (Theobald, y col., (1995) *supra*). Las moléculas de scTCR p264 marcadas con toxina se pueden inyectar en los ratones a dosificaciones pre-determinadas y se puede medir el efecto sobre el tamaño tumoral para evaluar la eficacia de las moléculas de sc-TCR. Además, se puede utilizar la extensión de la vía como segundo criterio para evaluar la eficacia de la nueva terapia anti-tumoral.

Se conocen otras moléculas efectoras o marcadores adecuados. Por ejemplo, un marcador es un polipéptido que alberga una carga a pH fisiológico, tal como por ejemplo, 6xHis. En este caso, el TCR de fusión o complejo conjugado se puede purificar por una matriz de metalo-sepharose disponible en el mercado tal como Nisepharose que es capaz de unirse específicamente al marcador 6xHis a un pH aproximado de 6-9. El epítipo EE y epítipo myc son ejemplos adicionales de marcadores proteicos adecuados, cuyos epítipos se pueden unir específicamente a uno o más anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado.

En algunos escenarios puede ser útil fabricar el TCR de fusión o complejos conjugados de la presente invención que sean polivalentes, por ejemplo, para aumentar la valencia del sc-TCR. Se establece en resumen que la proteína TCR polivalente se produce por unión en conjunto entre una y cuatro proteínas (la misma o diferente) utilizando, por ejemplo, técnicas de marcado con biotina-estreptavidina convencionales, o por conjugación a soportes sólidos adecuados tales como perlas de látex. Las proteínas entrecruzadas químicamente (por ejemplo dendrímeros entrecruzados) también son adecuadas como especies polivalentes. Por ejemplo, se puede modificar la proteína incluyendo secuencias que codifican restos de aminoácidos con cadenas laterales reactivas químicamente tales como Cys o His. Dichos aminoácidos con cadenas laterales reactivas químicamente se pueden posicionar en una variedad de posiciones en la proteína de fusión, preferentemente distales a la región de unión al antígeno del TCR. Por ejemplo, el extremo C de un fragmento de cadena C- $\beta$  de una proteína de fusión soluble, se puede unir covalentemente a un marcador de purificación proteica u otra proteína fusionada que incluyen dichos aminoácidos reactivos. Las cadenas laterales adecuadas se pueden incluir para unir químicamente dos o más proteínas de fusión a una partícula de dendrímero adecuada para dar lugar a una molécula multivalente. Los dendrímeros son polímeros químicos sintéticos que pueden tener uno cualquiera de varios grupos funcionales diferentes de su superficie (D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)). Los dendrímeros ejemplares para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, el dendrímero E9 starburst poliamina y el dendrímero E9 combust poliamina, que se pueden unir a restos de cisteína.

Como se utiliza en el presente documento, el término "célula" tiene la intención de incluir cualquier célula primaria o línea celular inmortalizada, cualquier grupo de dichas células como en un tejido o un órgano. Preferentemente las células son de mamífero y particularmente de origen humano, y puede infectarse por uno o más agentes patógenos. Una "célula huésped" de acuerdo con la invención puede ser una célula infectada o puede ser una célula tal como de *E. coli* que se puede utilizar para propagar un ácido nucleico descrito en el presente documento.

La unión covalente de la molécula efectora al péptido TCR de acuerdo con la invención proporciona varias ventajas significativas. Los complejos de fusión de TCR de la invención pueden producirse de manera que contenga una única molécula efectora, incluyen dicho péptido de estructura conocida. Adicionalmente, se puede producir una amplia variedad de moléculas efectoras de vectores ADN similares. Es decir, se puede unir una biblioteca de diferentes moléculas efectoras a la molécula de TCR por presentación de células infectadas o enfermas. Además, para las aplicaciones terapéuticas, más que la administración de una molécula de TCR a un sujeto, se puede administrar un vector de expresión de ADN que codifique la molécula TCR unida al péptido efector para la expresión *in vivo* del complejo del TCR de fusión. Dicha estrategia evita las etapas de purificación costosas que se asocian normalmente con la preparación de proteínas recombinantes y evita las complejidades de la captación de antígeno y el procesamiento asociados con las estrategias convencionales.

En particular, cada componente de la proteína de fusión se puede espaciar de otro componente por al menos una secuencia de engarce peptídico adecuado si se desea. De manera adicional, las proteínas de fusión pueden incluir marcadores, por ejemplo, para facilitar la identificación y/o purificación de la proteína de fusión. Más proteínas de fusión específicas se encuentran en los Ejemplos descritos posteriormente.

5 Los complejos de fusión de TCR de la invención también incluyen preferentemente una secuencia de engarce flexible interpuesta entre el TCR proteico y el péptido biológicamente activo. La secuencia de engarce debería permitir el posicionamiento eficaz del péptido biológicamente activo con respecto al agrupamiento de unión de la molécula de TCR de manera que el receptor de linfocito T pueda reconocer los complejos péptido-MHC que se presenten y pueda suministrar las moléculas biológicamente activas en un sitio deseado. La presentación satisfactoria de la molécula efectora puede modular la actividad de una celular para inducir o inhibir la proliferación de linfocitos T, o para iniciar o inhibir una respuesta inmunitaria contra un sitio particular, como se determina por los ensayos desvelados posteriormente incluyendo los ensayos *in vitro* que incluyen las etapas secuenciales de cultivar linfocitos T para proliferar las mismas, y poner en contacto los linfocitos T con un complejo de fusión de TCR de la invención y entonces evaluar si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo posterior de las células.

10 En general, la preparación de los complejos de fusión de TCR de la invención se puede conseguir por procedimientos desvelados en el presente documento por reconocidas técnicas de ADN recombinante que implican, por ejemplo, reacciones de amplificación en cadena de polimerasa (PCR), preparación de ADN plasmídico, escisión del ADN con enzimas de restricción, preparación de oligonucleótidos, ligadura de ADN, aislamiento de ARNm, introducción del ADN en una célula adecuada, transformación o transfección de un huésped, cultivo del huésped. De manera adicional, las moléculas de fusión se pueden aislar y purificar utilizando agentes caotrópicos y electroforéticos bien conocidos, centrifugación y procedimientos cromatográficos. Véase en general, Sambrook y col., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989); y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) para la divulgación relacionada con estos procedimientos.

15 La invención proporciona adicionalmente secuencias de ácido nucleico y particularmente secuencias de ADN que codifican las presentes proteínas de fusión. Preferentemente, la secuencia de ADN se alberga en un vector adecuado para la replicación extra-cromosómica tal como un fago, virus, plásmido, fagémido, cósmido, YAC, o episoma. En particular, se puede utilizar un vector de ADN que codifique la proteína de fusión deseada para facilitar los procedimientos preparatorios descritos en el presente documento y para obtener cantidades significativas de la proteína de fusión. La secuencia de ADN se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Se puede utilizar una variedad de sistemas vector-huésped para expresar la secuencia codificante de proteína. Estos incluyen los sistemas celulares de mamífero infectada con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cósmico. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, se puede utilizar uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Véase en general Sambrook y col., *supra* y Ausubel y col. *supra*.

20 En general, un vector de ADN preferido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos unida por enlaces fosfodiéster que comprende, en una dirección 5' a 3' un primer sitio de clonación para la introducción de una primera secuencia de nucleótido que codifica una cadena de TCR, unida operativamente a una secuencia que codifica una molécula efectora.

25 En la mayoría de los casos, se preferirá que cada uno de los componentes de la proteína de fusión codificados por el vector de ADN se proporcione en un formato de "casete". El término "casete" significa que cada uno de los componentes se puede sustituir fácilmente por otro componente por procedimientos recombinantes convencionales. En particular, un vector de ADN configurado en un formato de casete es particularmente deseable cuando el complejo de fusión codificado se va a utilizar contra agentes patógenos que pueden tener o tener la capacidad de desarrollar serotipos.

30 Para fabricar el vector que codifica un complejo de fusión de TCR, la secuencia que codifica la molécula de TCR está unida a una secuencia codificante del péptido efector mediante el uso de ligasas adecuadas. El ADN que codifica el péptido de presentación puede obtenerse aislando el ADN de fuentes naturales tales como a partir de una línea celular adecuada o por procedimientos sintéticos conocidos, por ejemplo, el procedimiento del triéster fosfato. Véase, por ejemplo, *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (M.J. Gait, ed., 1984). También se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos utilizando sintetizadores de oligonucleótidos automáticos disponibles en el mercado. Una vez aislados, el gen que codifica la molécula de TCR se puede amplificar por una reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros medios conocidos en la técnica. Los cebadores de PCR adecuados para amplificar el gen del péptido TCR pueden añadir sitios de restricción al producto de la PCR. El producto de la PCR incluye preferentemente sitios de corte y empalme para el péptido efector y secuencias líderes necesarios para la expresión y secreción apropiadas del complejo de fusión TCR-efector. El producto de la PCR también incluye preferentemente una secuencia codificante de la secuencia de engarce, o un sitio de enzimas de restricción para la unión de dicha secuencia.

Las proteínas de fusión descritas en el presente documento se producen preferentemente por técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, una vez que la molécula de ADN que codifica la proteína TCR está aislada, se puede ligar la secuencia a otra molécula de ADN que codifica el péptido efector. La secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de TCR puede unirse directamente a una secuencia de ADN que codifica el péptido efector o, más normalmente, una secuencia de ADN que codifica la secuencia del engarce que como se expone en el presente documento se pueden interponer entre la secuencia codificante de la molécula de TCR y la secuencia codificante del péptido efector y unirse utilizando ligasas adecuadas. La molécula de ADN híbrida resultante se puede expresar en una célula huésped adecuada para producir el complejo de fusión de TCR. Las moléculas de ADN se unen unas a otras en una orientación 5' a 3' de manera que, después de la unión, no se altera la fase traduccional de los polipéptidos codificados (es decir, las moléculas de ADN se unen unas a otras en fase). Las moléculas de ADN resultantes codifican una proteína de fusión en fase.

Se pueden incluir otras secuencias de nucleótidos en la construcción genética, Por ejemplo, una secuencia promotora, que controla la expresión de la secuencia codificante para el péptido de TCR fusionado al péptido efector, o una secuencia líder, que dirige el complejo de fusión de TCR a la superficie celular o el medio de cultivo, se pueden incluir en la construcción o está presente en el vector de expresión en el que se inserta la construcción. Se prefiere particularmente un promotor de inmunoglobulina o CMV.

Los componentes de la proteína de fusión se pueden organizar en casi cualquier orden a condición de que cada uno sea capaz de llevar a cabo su pretendida función. Por ejemplo, en una realización, el TCR está situado en el extremo C o N de la molécula efectora.

Las moléculas efectoras preferidas de invención como se ha definido anteriormente tendrán tamaños que dan lugar a la función para la que se pretenden los dominios. Las moléculas efectoras de la invención como se define anteriormente se pueden producir y fusionar al TCR por una variedad de procedimientos que incluyen procedimientos bien conocidos de entrecruzamiento químico. Véase, por ejemplo, Means, G.E. y Feeney, R.E. (1974) en *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. Véase también, S.S. Wong (1991) en *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press. Sin embargo, se prefiere en general el uso de modificaciones recombinantes para producir la proteína de fusión en fase.

Como se ha señalado, una molécula de fusión o una molécula conjugada de acuerdo con la invención se pueden organizar de varias maneras. En una configuración ejemplar, el extremo C del TCR está unido operativamente con el extremo N de la molécula efectora. Esta unión se puede conseguir por procedimientos recombinantes si se desea. Sin embargo, en otra configuración, el extremo N del TCR está unido al extremo C de la molécula efectora.

De manera alternativa, o además, se pueden insertar una o más moléculas efectoras adicionales en el TCR de fusión o complejos conjugados según se necesite.

Los complejos conjugados y de fusión preferidos de acuerdo con la presente invención normalmente incluyen unidos operativamente en secuencia (del extremo N al C): 1) un TCR/ una o más moléculas de engarce/ y una molécula biológicamente activa; 2) un TCR/molécula de engarce/ y una molécula biológicamente activa; y 3) un TCR/una primera molécula de engarce/una primera subunidad de molécula biológicamente activa/una segunda molécula de engarce/una segunda subunidad de molécula biológicamente activa. Además, se pueden fusionar uno o más marcadores proteicos tales como EE, HA, Myc, y polihistidina, particularmente 6xHis, al extremo N de las cadenas del TCR según se desee, por ejemplo, para mejorar la solubilidad o facilitar el aislamiento e identificación del TCR de fusión y complejos conjugados.

La secuencia de engarce es preferentemente una secuencia de nucleótido que codifica un péptido que puede posicionar eficazmente el agrupamiento de unión de la molécula de TCR para el reconocimiento de un antígeno presentado. Como se utiliza en el presente documento, la frase "péptido biológicamente activo que está posicionado eficazmente unido a una molécula de TCR", u otra frase similar, tiene la intención de significar que el péptido biológicamente activo unido a una proteína TCR está posicionado de manera que el péptido biológicamente activo es capaz de interactuar con las células efectoras y modular la actividad de una célula de presentación, para inducir la proliferación, iniciar o inhibir una reacción inmunitaria o para inhibir o inactivar el desarrollo celular como se determina por un ensayo desvelado posteriormente, incluyendo el ensayo que incluye las etapas secuenciales de cultivar células para proliferar las mismas, y poner en contacto las células con un complejo de fusión de TCR de la invención y luego evaluar si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo posterior de las células.

Preferentemente, la secuencia de engarce comprende desde aproximadamente 7 a 20 aminoácidos, más preferentemente desde aproximadamente 8 a 16 aminoácidos. La secuencia de engarce es preferentemente flexible de manera que no mantiene al péptido biológicamente activo en una única conformación no deseada. La secuencia de engarce se puede utilizar, por ejemplo, para espaciar el sitio de reconocimiento de la molécula fusionada. Específicamente, la secuencia de engarce peptídico se puede posicionar entre la cadena del TCR y el péptido efector, por ejemplo, para entrecruzar los mismos y proporcionar flexibilidad molecular. El engarce es preferentemente predominantemente comprende aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como la glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. Preferentemente aproximadamente el 80 o 90 por ciento o más de la secuencia del engarce comprende restos de glicina, alanina o serina, particularmente restos de glicina y

serina. Para un complejo de fusión de TCR que contiene un heterodímero de TCR, la secuencia de engarce se une adecuadamente a la cadena  $\beta$  de la molécula de TCR, aunque la secuencia de engarce también se puede unir a la cadena  $\alpha$  de la molécula de TCR. De manera alternativa, la secuencia de engarce se puede unir a ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la molécula de TCR. Para la unión covalente de una molécula efectora peptídica a una molécula de cadena  $\beta$  de TCR, la secuencia de aminoácidos del engarce debería ser capaz de mantener una distancia adecuada del resto del extremo N de la cadena  $\beta$  del TCR hasta el resto del extremo C de la molécula efectora peptídica. Cuando dicha cadena  $\beta$  + péptido se expresa junto con la cadena  $\alpha$ , el TCR unido-péptido efector debería plegarse dando como resultado una molécula de TCR funcional como se representa en general en la Figura 1. Una secuencia de engarce adecuada es ASGGGSGGG SEQ ID NO: 1 (es decir, Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly), preferentemente unida al primer aminoácido del dominio  $\beta$  del TCR. Se podrían utilizar diferentes secuencias de engarce incluyendo cualquiera de varios diseños de engarces flexibles que se han utilizado satisfactoriamente para unir juntas regiones variables de anticuerpo, véase Whitlow, M. y col., (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105. Secuencias de engarce adecuadas que fácilmente se pueden identificar empíricamente. Adicionalmente, el tamaño adecuado y las secuencias de las secuencias de engarce también se pueden determinar por técnicas de modelado por computadora convencionales basadas en el tamaño y formas previstos de la molécula de TCR.

Se pueden emplear varias estrategias para expresar complejos de fusión de TCR de la invención. Por ejemplo, la construcción de fusión genética TCR descrita anteriormente se puede incorporar en un vector adecuado por medios conocidos tales como por el uso de enzimas de restricción para hacer cortes en el vector para la inserción de la construcción seguida por ligadura. El vector que contiene la construcción genética se introduce entonces en un huésped adecuado para la expresión del péptido de fusión de TCR. Véase, en general, Sambrook y col., *supra*. La selección de vectores adecuados se puede hacer empíricamente basándose en factores relativos al protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debería ser compatible con, y tener el replicón apropiado para el huésped que se va a emplear. Además, el vector debería ser capaz de acomodar la secuencia de ADN que codifica el complejo de fusión de TCR que se va a expresar. Las células huésped adecuadas incluyen células eucariotas y procariontes, preferentemente las células que se pueden transformar fácilmente y presentan un rápido crecimiento en medio de cultivo. Específicamente las células huésped preferidas incluye procariontes tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Se prefieren en general células de mamífero, particularmente J558, NS0, SP2-O o CHO. Otros huéspedes adecuados incluyen, por ejemplo, células de insecto tal como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, *supra*. Se pueden seleccionar entonces líneas celulares transformadas o transfectadas establemente. Las células que expresan un complejo de fusión de TCR de la invención se puede determinar por procedimientos conocidos. Por ejemplo, la expresión de un complejo de fusión de TCR unido a una inmunoglobulina se puede determinar por un ELISA específico para la inmunoglobulina unida y/o por inmunotransferencia.

Como se ha mencionado anteriormente en general, se puede utilizar una célula huésped para fines preparativos para propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada. Por lo tanto, una célula huésped puede incluir una célula procarionte o eucariota en cuya producción de la proteína de fusión se pretende específicamente. Por lo tanto, las células huésped incluyen específicamente, levaduras, moscas, gusanos, plantas, ranas, células y órganos de mamífero que son capaces de propagar el ácido nucleico. Ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen células CHO dhfr (Urlaub y Chasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)), células 293 (Graham y col., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)) o células de mieloma tipo SP2 o NS0 (Galfre y Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3 (1981)).

Las células huésped capaces de propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada engloba células eucariotas no de mamífero también, que incluyen insectos (por ejemplo, *Sp. frugiperda*), levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; como se revisa en general por Fleer, R., *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496 (1992)), células fúngicas y vegetales. También se contemplan ciertas procariontes tales como *E. coli* y *Bacillus*.

El ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada se puede introducir en una célula huésped por técnicas convencionales para transfectar células. El término "transfectar" o "transfección" tiene la intención de englobar todas las técnicas convencionales para introducir un ácido nucleico en células huésped, incluyendo coprecipitación en fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, transducción y/o integración vírica. Los procedimientos adecuados para transfectar células huésped se pueden encontrar en Sambrook y col. *supra*, y otros libros de texto de laboratorio.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento de producción para el aislamiento de una proteína de fusión de interés. En el procedimiento, una célula huésped (por ejemplo, una célula de levadura, hongo, insecto bacteriana o animal), en la que se habían introducido un ácido nucleico que codifica la proteína de interés unido operativamente a una secuencia reguladora, se cultiva a una escala de producción en un medio de cultivo en presencia de la proteína de fusión para estimular la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de interés. Posteriormente, la proteína de fusión de interés se aísla de las células huésped recolectadas o del medio de cultivo. Se pueden utilizar técnicas de purificación convencionales para aislar la proteína de interés del medio o de las células recolectadas. En particular, se pueden utilizar técnicas de purificación para expresar y purificar una proteína de fusión deseada a gran escala (es decir, en al menos cantidades de miligramos) desde una variedad de implementaciones que incluyen botellas giratorias, matraces de centrifugación,

placas de cultivo tisular, un biorreactor, o un fermentador.

Un complejo de fusión de TCR expresado se puede aislar y purificar por procedimientos conocidos. Normalmente el medio de cultivo se centrifuga y entonces se purifica el sobrenadante por afinidad o cromatografía de inmunofinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G o un protocolo de inmunofinidad que comprende el uso de anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de fusión expresado tal como un TCR unido o una región de inmunoglobulina del mismo. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden separar y purificar por una combinación apropiada de técnicas conocidas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, procedimientos que utilizan la solubilidad tal como la precipitación en sal y la precipitación en disolventes, procedimientos que utilizan la diferencia de peso molecular tales como la diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, y electroforesis SDS – gel de poliacrilamida, procedimientos que utilizan una diferencia de la carga eléctrica tales como la cromatografía en columna de intercambio iónico, procedimientos que utilizan afinidad específica tales como la cromatografía de afinidad, procedimientos que utilizan una diferencia en la hidrofobia tal como cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa y procedimientos que utilizan una diferencia en el punto isoelectrico, tal como la electroforesis isoelectrica enfocada, columnas de afinidad metálica tal como Ni-NTA. Véase en general Sambrook y col. y Ausubel y col. *supra* para una divulgación relativa a estos procedimientos.

Se prefiere que las proteínas de fusión de la presente invención sean sustancialmente puras. Es decir, las proteínas de fusión se han aislado a partir de sustituyentes celulares que acompañan naturalmente de manera que las proteínas de fusión estén presentes preferentemente en al menos el 80 % o el 90 % al 95 % de homogeneidad (p/p). Las proteínas que tienen al menos un 98 a 99 % de homogeneidad (p/p) son las más preferidas para muchas aplicaciones farmacéuticas, clínicas y de investigación. Una vez purificada sustancialmente la proteína de fusión debería estar sustancialmente libre de contaminantes para aplicaciones terapéuticas. Una vez purificadas parcialmente o hasta una pureza sustancial, las proteínas de fusión solubles se pueden utilizar terapéuticamente, o para llevar a cabo ensayos *in vitro* o *in vivo* como se desvela en el presente documento.

Los complejos de fusión de TCR truncados de la invención contienen una molécula de TCR que está suficientemente truncada para que el complejo de fusión de TCR se pueda secretar en el medio de cultivo después de la expresión. Por lo tanto, un complejo de fusión de TCR no incluirá regiones ricas en restos hidrófobos, normalmente los dominios transmembrana y citoplasmático de la molécula de TCR. Por lo tanto, por ejemplo, para una molécula de TCR DR1 truncada preferida de la invención, preferentemente desde aproximadamente los restos 199 a 237 de la cadena  $\beta$  y desde aproximadamente los restos 193 a 230 de la cadena  $\alpha$  de la molécula de TCR no se incluyen en el complejo de fusión de TCR truncado.

La expresión "mal plegado" cuando se relaciona con las proteínas de fusión significa una proteína que está parcial o completamente desplegada (es decir, desnaturalizada) Una proteína de fusión puede estar parcial o completamente desplegada por contacto con uno o más agentes caotrópicos como se expone posteriormente. Más generalmente, las proteínas de fusión mal plegadas desveladas en el presente documento son representativas de una forma Gibbs de alta energía libre ( $\Delta G$ ) de la proteína nativa correspondiente. Se prefieren proteínas de fusión nativas que están normalmente correctamente plegadas, son completamente solubles en solución acuosa, y tienen una  $\Delta G$  relativamente baja. En consecuencia, la proteína de fusión nativa es estable en muchos casos.

Es posible detectar el mal plegamiento de una proteína de fusión por una o una combinación de estrategias convencionales. Por ejemplo, el mal plegamiento se puede detectar por una variedad de técnicas biofísicas convencionales incluyendo las medidas de rotación óptica que utilizan nativas (control) y moléculas mal plegadas.

El término "soluble" o términos similares significan que la molécula de fusión y particularmente una proteína de fusión que no sedimenta fácilmente bajo centrifugación de baja fuerza G (por ejemplo, menos de aproximadamente 30.000 revoluciones por minutos en una centrifuga convencional) a partir de un tampón acuoso, por ejemplo, un medio celular. Además, la molécula de fusión es soluble si permanece en solución acuosa a una temperatura mayor de aproximadamente 5-37 °C y a o cerca de un pH neutro en presencia de baja concentración o ninguna de un detergente aniónico o no iónico. En estas condiciones, una proteína soluble a menudo tiene un valor de sedimentación bajo, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 a 50 unidades svedberg.

Las soluciones acuosas a las que se hace referencia en el presente documento normalmente tienen un compuesto tampón para estabilizar el p, normalmente en un intervalo de pH de aproximadamente 5-9, y un intervalo de fuerza iónica entres aproximadamente 2 mM y 500 mM. A veces, se añade un inhibidor de proteasa o un detergente no iónico suave. Adicionalmente, se puede añadir un vehículo proteico si se desea tal como albúmina sérica bovina (BSA) a pocos mg/ml. Los tampones acuosos ejemplares incluyen solución salina tampón de fosfato convencional, solución salina tampón tris, u otros tampones conocidos y formulaciones de medios celulares.

El presente TCR de fusión y los complejos conjugados son adecuados para su uso *in vitro* o *in vivo* con una variedad de células que se infectan o que pueden infectarse por una o más enfermedades.

Como una ilustración del uso de los agentes de TCR de fusión/conjugado terapéuticos, se puede infectar una célula cultivada por un agente patógeno de un único serotipo. La célula infectada se pone en contacto entonces con una proteína de fusión específica *in vitro*. Como se ha expuesto previamente, la proteína de fusión se configura de

manera que el dominio tóxico se presenta en la célula infectada por asociación del TCR. Después de proporcionar la introducción de la molécula bioactiva en la célula (generalmente menos de aproximadamente 30 minutos), se permite que las células produzcan un efecto deseado durante un periodo de tiempo de aproximadamente hasta aproximadamente 2 a 24 horas, normalmente aproximadamente 18 horas. Después de este momento, las células se lavaron en un tampón o medio celular adecuado y entonces se evaluaron en cuanto a la viabilidad. El tiempo asignado para la destrucción o daño celular por la proteína de fusión variará con la molécula efectora particular escogida. Sin embargo, la viabilidad a menudo se puede evaluar después de aproximadamente 2 a 6 horas hasta aproximadamente 24 horas. Como se explicará con más detalle posteriormente, la viabilidad celular se puede medir fácilmente y cuantificarse controlando la captación de ciertos colorantes bien conocidos (por ejemplo, azul de tripán) o flúor.

Las células transducidas por las moléculas de fusión de la presente invención se puede ensayar en cuanto a la viabilidad por procedimientos convencionales. En una estrategia, la viabilidad celular puede ensayarse fácilmente midiendo la replicación de ADN a continuación o durante la transducción. Por ejemplo, un ensayo preferido implica la captación celular de uno o más nucleósidos marcados detectablemente tales como la timidina radiomarcada. La captación se puede medir convenientemente por varias estrategias convencionales incluyendo la precipitación en ácido tricloroacético (TCA) seguido por recuento por centelleo. Otros procedimientos de viabilidad celular incluyen las técnicas de exclusión de azul tripán bien conocidas.

Las moléculas de TCR de los complejos de fusión de la invención corresponden adecuadamente en secuencia de aminoácidos a las moléculas de TCR de origen natural, por ejemplo moléculas de TCR de un ser humano, ratón u otro roedor, u otro mamífero.

En consecuencia, un procedimiento de tratamiento de la invención para la inhibición de una respuesta autoinmunitaria o inflamatoria incluiría un complejo de TCR que comprende una molécula efectora antagonista de un receptor de linfocito T. Preferentemente, se administra un complejo de TCR soluble "truncado", es decir, el complejo de TCR que no contiene una porción transmembrana. Se puede seleccionar la molécula efectora del complejo de fusión de TEC soluble administrada para que sea específico para ciertas células o específico para generar un resultado deseado. Dicha molécula efectora puede identificarse y seleccionarse fácilmente por los procedimientos de un experto en la técnica. Un complejo de fusión TCR que contiene un péptido efector que es un antagonista o agonista parcial del receptor de linfocito T es particularmente útil en el tratamiento de alergias y enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente y artritis reumatoide.

Otro procedimiento de tratamiento para la inducción de una respuesta inmunitaria proporciona la administración de una cantidad eficaz de uno o más complejos de fusión de TCR de la invención en presencia de cualquier molécula efectora co-estimulante tal como una citocina para de esta manera inducir una respuesta inmunitaria deseada en la localización del antígeno presentado que se une al TCR. El complejo de fusión de TCR puede estar en una forma truncada y se puede administrar como una proteína soluble como se ha descrito anteriormente. De manera alternativa, el complejo de fusión de TCR puede ser de longitud completa, es decir, contendrá la porción transmembrana. El tratamiento con estos complejos comprenderá la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una secuencia de ADN que comprende un vector de ADN que codifica el complejo de fusión de TCR de longitud completa de la invención y una molécula efectora.

También se pueden utilizar diferentes terapias basándose en la invención en combinación así como con otros agentes terapéuticos conocidos tales como fármacos anti-inflamatorios para proporcionar un tratamiento más eficaz de un trastorno. Por ejemplo, complejos de fusión de TCR inmunosupresores que se pueden utilizar en combinación con agentes anti-inflamatorios tales como los fármacos corticosteroides y no esteroideos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y alergias.

Los compuestos de la invención serán especialmente útiles para un paciente humano que tiene o es sospechoso de tener una enfermedad, cancerosa maligna trastorno o afección. Los compuestos de la invención serán particularmente útiles en el direccionamiento de antígenos tumorales particulares en pacientes humanos. Ejemplos específicos de enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen cánceres, por ejemplo, de mama, próstata, etc.; infecciones víricas, por ejemplo, por VHC, VIH, etc. así como otros trastornos específicos de afecciones mencionadas en el presente documento.

Sin el deseo de quedar ligado por teoría alguna, se cree que los compuestos distintos y múltiples unidos covalentemente de la presente invención (es decir, al menos un fármaco anti-cáncer identificado en combinación con al menos un TCR) puede aumentar significativamente la eficacia del fármaco anti-cáncer, por ejemplo, aumentando el direccionamiento del fármaco al antígeno diana en sujetos individuales.

Además, gracias al enlace covalente, los conjugados de la invención presentan el fármaco anti-cáncer y el TCR da la célula objeto esencialmente simultáneamente, un efecto que puede no conseguirse fácilmente administrando los mismos compuestos en una formulación de "coctel" de fármacos sin la unión covalente de los compuestos.

También se ha informado de que el tratamiento con un fármaco puede a su vez sensibilizar a un paciente a otro fármaco. En consecuencia, la presentación esencialmente simultánea a la célula objeto de un fármaco anti-cáncer y

TCR mediante un conjugado de la invención puede aumentar la actividad del fármaco, por ejemplo, proporcionando resultados sinérgicos y/o aumentando la producción de una respuesta inmunitaria.

La administración de compuestos de la invención puede hacerse por una variedad de vías adecuadas incluyendo la oral, tópica (incluyendo transdérmica, bucal o sublingual), nasal y parenteral (incluyendo la inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular) siendo la oral o parenteral preferidas en general. También se apreciará que el procedimiento de administración y cantidad de dosificación preferidos puede variar con, por ejemplo, la afección y la edad del receptor.

Los compuestos de la invención se pueden utilizar en terapia, solos o en conjunción con otros medicamentos tales como los que tienen una actividad farmacológica reconocida para tratar las indicaciones deseadas. Los medicamentos ejemplares incluyen terapias reconocidas tales como cirugía, radiación, quimioterapia y otras formas de inmunoterapia (por ejemplo, vacunas, terapias basadas en anticuerpos). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar antes, durante o después de dichas terapias según se necesite.

Aunque se pueden administrar uno o más compuestos de la invención solos, también pueden estar presentes como parte de una composición farmacéutica mezclados con un excipiente convencional, es decir, sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas adecuadas para la administración parenteral, oral u otra que se desee y que no reacciona de manera perjudicial con los compuestos activos y no son perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones de la invención en general comprenden uno o más complejos de fusión de TCR de la invención o construcciones de ADN que codifican dichos complejos de fusión junto con uno o más vehículos aceptables. Los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de que sean compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato magnésico, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroethral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias saborizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionen perjudicialmente con los compuestos activos.

Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas soluciones, preferentemente soluciones oleosas o acuosas así como suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo los supositorios. Las ampollas son unidades de dosificación convenientes.

Para la aplicación enteral, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas o cápsulas que tienen un vehículo aglutinante de talco y/o carbohidratos o similares, siendo el vehículo preferentemente lactosa y/o almidón de maíz y/o almidón de patata. Se puede utilizar un jarabe, elixir, o similar en el que se emplea un vehículo edulcorante. Se pueden formular composiciones de liberación sostenida que incluyen en los que el principio activo se protege con revestimientos degradables diferencialmente, por ejemplo, por microencapsulación, múltiples revestimientos, etc.

Los compuestos terapéuticos de la invención también se pueden incorporar en liposomas. La incorporación puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos de preparación de liposomas conocidos, por ejemplo, sonicación y extrusión. Los procedimientos convencionales adecuados de preparación de liposomas se desvelan también en, por ejemplo, A.D. Bangham y col., *J. Mol. Biol.*, 23:238-252 (1965); F. Olson y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9-23 (1979); F. Szoka y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75:4194-4198 (1978); S. Kim y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339-348 (1983); y Mayer y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168 (1986).

La invención también describe procedimientos que provocan una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ser humano, que incluyen la vacunación de un mamífero tal como un ser humano contra un agente infeccioso o un trastorno direccionado tal como un cáncer.

Estos procedimientos comprenden la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una secuencia de ADN que comprende un vector de ADN que codifica un complejo de fusión de TCR de la invención. La preparación de vectores de expresión de los complejos de fusión de TCR se describe anteriormente y en los Ejemplos siguientes. Los procedimientos para la administración de un ADN plasmídico, captación de ese ADN por las células del sujeto al que se administra y la expresión de proteína se ha informado. Véase, Ulmer, J.B., y col., *Science* (1993) 259: 1745-1749.

Los vectores de ADN que codifican los complejos de fusión de TCR de la invención se administran adecuadamente a un mamífero incluyendo un ser humano, preferentemente por inyección intramuscular. La administración de ADN en el músculo esquelético de un mamífero con la posterior captación del vector de expresión administrado por las células musculares y la expresión de proteína codificada por el ADN se ha descrito por Ulmer y col. y representa un protocolo ejemplar [Ulmer, J.B., y col., *Science* 259: 1745-1749]. La dosis óptima de una aplicación terapéutica determinada se puede determinar por medios convencionales.

Además del tratamiento de trastornos humanos, el TCR de fusión y los complejos conjugados de la invención y las construcciones de la invención que codifican dichos complejos de fusión tendrá un uso significativo para aplicaciones veterinarias, por ejemplo, el tratamiento de trastornos del ganado tal como bovino, ovejas, etc. y mascotas tales como perros y gatos.

- 5 Se apreciará que las cantidades preferidas actuales de un complejo de fusión de TCR determinado de la invención o una construcción de ADN que codifica el mismo que se utiliza en una terapia determinada variará de acuerdo con el compuesto o compuestos que se utilicen, la composición particular que se formule, el modo de aplicación, el sitio particular de administración, el peso del paciente, la salud general, el sexo, etc. la indicación particular que se va a tratar, etc., y otros de dichos factores que son reconocidos por los expertos en la técnica incluyendo el médico o veterinario encargados. Las tasas de administración óptima para un protocolo de administración determinado se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica utilizando ensayos de determinación de dosificación convencional llevados a cabo, por ejemplo, con respecto a las directrices anteriores y los ensayos desvelados en el presente documento.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención.

## 15 **Ejemplo 1**

Construcción del TCR de cadena simple 264

- El clon de linfocito T, 264, reconoce un fragmento peptídico (aa 264-272; LLGRNSFEV) de la proteína p53 de tipo silvestre humana supresora del tumor restringida a HLA-A2.1. El gen del receptor de linfocito T se clonó en un formato de tres dominios de cadena sencilla que previamente demostró producir un TCR soluble y moléculas receptoras funcionales.

- En resumen, se aisló el ARNm del clon de linfocito T y se produjo el ADNc utilizando el kit de amplificación de ADNc Marathon (Clontech). La secuenciación de los clones de ADNc identificó dos cadenas V alfa distintas (V alfa 3 y V alfa 123) y una única cadena V beta (V beta 3). El ADNc se utilizó como matriz en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores KC228 y KC229 o KC226 y KC227 para producir los fragmentos 5' Sfil-3' Spel V alfa 3 o V alfa 13 respectivamente. El mismo ADN se utilizó entonces como una matriz de PCR con los cebadores PRIB4 y KC176 para generar el fragmento 5' XhoI-3' XmaI cadena V beta C beta. La cadena C beta estaba truncada justo antes del resto de cisteína en el aminoácido 127 de la cadena C beta de longitud completa.

- Los fragmentos de cadena alfa y beta se clonaron en el Sistema de Vector pGEM-T Easy (Promega) para la determinación de secuencia de ADN. Los fragmentos correctos se digirieron por restricción y se clonaron en el vector de expresión pKC60 (descrito previamente en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite nº 08/813.731) para crear dos moléculas V alfa-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> V beta C beta de scTCR, 264-A (con V alfa 3) y 264-B (con V alfa 13).

- Las construcciones de ADN descritas anteriormente (264-A y 264-B) se re-amplificaron por PCR con los cebadores ET-TCRF1 y KC170 o ET-TCRF2 y KC170, respectivamente, para generar fragmentos de ADN 5'Agel-3'ClaI. Los fragmentos se clonaron en el Sistema de Vector pGEM-T Easy para la determinación de la secuencia de ADN.

- Los fragmentos 5'Agel-3'ClaI se utilizaron entonces como matriz de ADN en la PCR con los cebadores KC232 y KC208 o KC231 y KC208, respectivamente, para producir fragmentos de ADN 5'Agel-3'HpaI para clonación en la molécula de fusión CD3 zeta (descrita posteriormente) y eventualmente la molécula de fusión 264-IL-2 (descrita posteriormente).

## **Ejemplo 2**

- 40 Construcción del vector de fusión CD3 zeta

Para determinar cuál de las dos cadenas V alfa era funcional, se expresaron la 264-A y 264-B scTCR como moléculas de fusión CD3 zeta. La construcción de un vector lanzadera se había descrito previamente en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite nº 09/422.375.

- En resumen, los fragmentos de cadena alfa y beta de TCR se clonaron en el vector de expresión pKC60 para crear una molécula V alfa-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> V beta C beta de scTCR. El nuevo vector se llamó pNAG2 (Fig. 9), el pNAG2 se re-amplificó entonces por PCR con los cebadores KC203 y KC208 para generar el fragmento de ADN 5'Agel-3'HpaI/BspEI/NruI/ClaI. El fragmento scTCR se clonó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy y este nuevo vector basado en pGEM se utilizó entonces como un "vector lanzadera" para la introducción de otros fragmentos de ADN para crear una molécula sc biespecífica.

- 50 El scFv ADN se digirió por restricción y se clonó en el "vector lanzadera" corriente abajo del scTCR. Para conectar el scTCR y el scSc-Fv junto con una proteína de fusión de cadena sencilla, el "vector lanzadera" se digirió con las enzimas de restricción apropiadas para dejar el previo fragmento de ADN engarce y permitir la unión de secuencias engarce entre el scTCR y el scFv.

En el diseño del “vector lanzadera” descrito anteriormente, se introdujeron un codón de parada y un sitio de corte y empalme entre los sitios de restricción NruI y ClaI como parte de la amplificación por PCR del scTCR con el cebador “trasero” KC208. Para añadir una purificación corriente abajo de la proteína sc biespecífica, se diseñó un conjunto u oligos hibridados (KC237 y KC238) para introducir un marcador 3' EE (EEEEYMPME) SEQ ID NO: 2 con codón de

5 5'NruI-3'ClaI en el “vector lanzadera” ya codifica la molécula sc biespecífica completa.

Después de la clonación de los fragmentos de ADN de scTCR, scFv, engarce y marcador en el “vector lanzadera” para completar el diseño de la molécula sc biespecífica, el ADN se digirió por restricción (AgeI-ClaI) y se clonó en el vector de expresión celular de mamífero pSUN27 (Fig. 10) (descrito previamente en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite serie n°. 08/943.086 para crear pBISP/149 (Fig. 11).

10

Construcción del Vector de fusión CD3 zeta

En resumen, se utilizó un ADNc murino como matriz en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores KC312 y KC304 para producir un fragmento CD3 zeta murino 5'HpaI-3'ClaI.

El fragmento CD3 zeta murino se clonó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy para la determinación de la secuencia de ADN. El fragmento correcto se digirió por restricción y se clonó en el “vector lanzadera”, retirando eficazmente el engarce existente, scFv, y marcador EE.

15

Después de la clonación del gen CD3 zeta en el “vector lanzadera”, el ADN se digirió con AgeI-HpaI para permitir la unión con los fragmentos 264-A y 264-B scTCR (descrito anteriormente), creando dos nuevas fusiones scTCR/CD3 zeta. Por último, las nuevas preparaciones de ADN se digirieron por restricción (AgeI-ClaI) y se clonaron en el vector de expresión celular de mamífero pSUN28 (vector pBISP/DO 11. 10), Fig. 11 descrito previamente en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite n° 09/422.375.

20

### Ejemplo 3

Expresión de moléculas de fusión 264 scTCR/CD3 zeta (de referencia)

Se prepararon células Jurkat para la transfección lavado con DPBS frío. Las células se re-suspendieron en DPBS y se mezclaron con 20 ug de PvuI 264-A/CD3 zeta o 264-B/CD3 zeta DNA alineado. Después de cinco minutos en hielo, las células se electroporaron utilizando un aparato Gene Pulser (Bio-Rad) para suministrar un pulso de 250 voltios, 960 u Fd o 0,15 u Fd. Las células pulsadas se colocaron en hielo durante cinco minutos. Las células se diluyeron en 10 ml de medio IMDM al 10 % (IMDM, 10 % de FBS, 2 mM de glutamina) y se cultivaron en un matraz TC T-25 cm<sup>2</sup> durante una noche a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células se colocaron en placas de 96 pocillos con medio selectivo (10 % IMDM más 1,0 mg/ml G418). Después de una semana, la concentración de G418 aumentó a 2 mg/ml. Las colonias en crecimiento se re-alimentaron aproximadamente dos semanas después de la transfección y se exploraron aproximadamente una semana más tarde.

25

30

Las células Jurkat transfectadas se exploraron en cuanto a la expresión de superficie de scTCR utilizando un análisis de citometría de flujo. Los transfectantes positivos se identificaron por tinción con un mAb marcado fluorescentemente (H57-597) que detecta una parte del dominio C beta de un TCR murino.

35

### Ejemplo 4

Identificación del dominio 264 scTCR V alfa correcto

Las células Jurkat transfectadas que expresaban la versión 264-A o 264-B de la molécula de fusión CD3 zeta se utilizaron en un ensayo de activación celular. En el ensayo, la línea celular T2 presentadora de HLA-A2 se utilizó como la APC. Las células T2 se cargaron con el péptido 264 (o péptido irrelevante) durante una noche a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las líneas Jurkat transfectadas se añadieron y se permitió que interactuaran con las APC pulsadas con el péptido durante una noche.

40

La estimulación específica de los transfectantes por APC cargadas de 264 se evaluó utilizando un ELISA IL-2. Un mAb anti-IL-2 humana revistió pasivamente durante una noche una placa de 96 pocillos. La placa se lavó y se bloqueó con un 10 % de FBS/DPBS durante 1 hora. El reactivo de bloqueo se retiró y los sobrenadantes del ensayo se añadieron a la placa durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, se detectó la IL-2 utilizando otro mAb anti-IL-2 conjugado con biotina. Después de 45 minutos a 37 °C la placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP durante 15 minutos. Finalmente, la placa se lavó y se desarrolló utilizando el sustrato ABTS. Se leyó la absorción a 405 nm.

45

Basándose en el ensayo de activación celular, el dominio V alfa 3 es funcional. Solamente se estimuló la molécula 264-A para que produjera IL-2 en presencia de APC cargadas con el péptido 264.

50

### Ejemplo 5

Construcción de la molécula de fusión 264 scTCR/IL-2 (de referencia)

Para generar la molécula de fusión scTCR/IL-2, el gen de IL-2 humano necesitaba clonarse en un vector de ADN de expresión.

5 En resumen, el ARN total se aisló a partir de células Jurkat humanas utilizando el kit Mini Total (Qiagen) y el Qiashredder (Qiagen). El ARN se concentró y se utiliza en una reacción con transcriptasa inversa y un cebador trasero específico KC328B, para generar ADNc. El ADNc se utilizó como la matriz en la PCR con los cebadores KC327B y KC328B para producir el fragmento del gen de IL-2 humana 5'Bspl3'NruI.

El fragmento de IL-2 humana se clonó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy para la determinación de secuencia. El fragmento correcto se digirió por restricción y se clonó en el "vector lanzadera", retirando eficazmente el gen scFv existente.

10 El "vector lanzadera modificado por IL-2" se digirió por restricción (Bspl-NruI) y el scTCR (descrito anteriormente) se ligó para completar el diseño de scTCR/IL-2. Finalmente, el ADN se cortó con AgeI-ClaI y se clonó en el vector de expresión pSUN28 de células de mamífero.

### Ejemplo 6

Construcción de la molécula de fusión 149 scTCR/IL-2 (de referencia)

15 Para crear la versión del 149 scTCR (descrito en detalle en la solicitud de patente 09/422.375) de la fusión IL-2, el 149 scTCR se cortó del "vector lanzadera" (véase el ejemplo y de la solicitud de patente 09/422.375) como un fragmento 5'AgeI-3'HpaI y entonces se ligó en el "vector lanzadera modificado con IL-2" (descrito anteriormente). El fragmento 149 scTCR/IL-2 se digirió entonces por restricción (AgeI-ClaI) y se clonó en el vector de expresión pSUN28 de células de mamífero.

### 20 Ejemplo 7

Expresión de Moléculas de fusión scTCR/IL-2 (de referencia)

25 Las células CHO se prepararon para la transfección lavando con DPBS frío. Las células se re-suspendieron en DPBS y se mezclaron con 20 ug de PvuI 264 scT-CR/IL-2 o 149 scTCR/IL-2 alineado. Después de cinco minutos en hielo, las células se electroporaron utilizando un aparato Gene Pulser para suministrar un pulso de 250 voltios, 960 u Fd o 0,25 u Fd. Las células pulsadas se colocaron en hielo durante cinco minutos. Las células se diluyeron en 10 ml de 10 % de medio IMDM (IMDM, 10 % de FBS, 2 mM de glutamina) y se cultivaron en matraces T-25 cm<sup>2</sup> TC durante una noche a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente las células se colocaron en placas de 96 pocillos con medio selectivo (10 % IMDM más 1 mg/ml de G418) y se re-alimentó después de aproximadamente 7 días.

30 Los transfectantes se exploraron en cuanto a la expresión de moléculas de fusión solubles en un formato de ensayo ELISA. Un anticuerpo anti-IL-2 humano revistió pasivamente la placa de 96 pocillos. El día del ensayo, las placas se bloquearon con un 120 % de FBS/PBS durante uno hora. Los pocillos se lavaron y se añadió el sobrenadante de los transfectantes a la placa. Después de incubar y lavar, se añadió el mAb H57-597 anti-C beta (la línea celular se adquirió en la ATCC) a la placa, seguido por el lavado y la incubación con estreptavidina-HRP. Los pocillos positivos se identificaron por la adición de sustrato TMB, se inactivaron con ácido sulfúrico 1 N, y se leyó a una absorbancia de 450 nM. Un pequeño número de clones positivos se seleccionaron por expansión y se llevó a cabo una clonación por dilución limitante para establecer las líneas celulares estables.

35 Los transfectantes también se podían explorar en cuanto a la expresión de moléculas de fusión en un formato de ensayo ELISA que utiliza mAb que reconocen específicamente cada uno de los scTCR seguido por la detección con mAb anti-C beta biotinilado y estreptavidina-HRP. Para la molécula de fusión 149, se utilizó un mAb conformacional contra el dominio V alfa (B20.1, Pharmagen) como el anticuerpo de revestimiento. La molécula de fusión 264 se podía detectar utilizando el mAb conformacional contra su dominio V beta (KJ25, Pharmingen).

### Ejemplo 8

Purificación de proteína de fusión scTCR/IL-2 (de referencia)

45 Las proteínas de fusión TCR/IL-2 se purificaron a partir del sobrenadante de transfectantes utilizando procedimientos de cromatografía de afinidad. Las proteínas de fusión se aplicaron a una columna de agarosa acoplada a CNBR específica de Coo anti-TCR para el enriquecimiento. En resumen, el sobrenadante se pasó sobre el lecho de la columna una vez. Después del lavado con PBS, la proteína unida se eluyó de la columna por la adición de tampón de glicina a pH bajo (pH 3,0) e inmediatamente se neutralizó con la adición de 1 a 10 diluciones de Tris 2 M, pH 8,0. La proteína purificada se intercambió de tampón en PBS utilizando un corte de 30 kD de PM como unidad de concentración. La concentración final proteica se determinó por lectura a una DO 280. La tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada (Fig. 2) y el análisis de inmunotransferencia de la proteína purificada (Fig. 2) muestra el enriquecimiento para la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2.

**Ejemplo 9**

## Ensayo de proliferación CTLL-2

La línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2, se utilizó para evaluar la actividad de IL-2 de la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2 utilizando un ensayo de proliferación celular no radioactivo. La proteína de fusión 264 scTCR-h se utilizó en el ensayo como un control negativo. En resumen, las células CTLL-2 que se utilizaron para el ensayo se sembraron a  $10^4$  células/ml y se les permitió crecer durante 48 horas con el fin de agotar la IL-2 residual. Durante el periodo de 48 h las células crecieron hasta una densidad de  $1,15 \times 10^5$  células/ml. Las células se recolectaron entonces y se lavaron varias veces utilizando un 10 % de IMDM (con/sin IL-2) para retirar toda la IL-2 restante. Se utilizó una placa de 96 pocillos de fondo plano para el ensayo. Primero, 50 ul de medio (IMDM al 10 %), medio con IL-2 o 264-IL-2 o proteína de fusión 264-κ se añadieron a cada pocillo. Las células CTLL-2 se añadieron a los pocillos a  $10^5$  células/50 ul. Una IL-2 de referencia se ejecutó en la misma placa. La placa se incubó durante una noche a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, la muerte celular era claramente evidente utilizando un microscopio. La proliferación/viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo Celltiter. El ensayo CellTiter 96 es un ensayo de proliferación celular no radioactivo acuoso comercializado por Promega Corp. El ensayo está compuesto de soluciones de un nuevo compuesto de tetrazolio, MTS, y un reactivo de acoplamiento de electrones; pMS. El MTS es biorreducido por las células en formazan que es soluble en el medio de cultivo tisular. La absorbancia del formazan a 490 nm puede medirse directamente en las placas de ensayo de 96 pocillos sin un procesamiento adicional. La conversión de MTS en formazan acuoso soluble se consigue por enzimas deshidrogenasa que se encuentran en células metabólicamente activas. La cantidad de producto formazan medida por la cantidad de absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Las proteínas de fusión 264/IL-2 y 264-κ se ensayaron en cuanto a la actividad diluyendo desde 1,25 mg/pocillo a 0,0098 mg/pocillo.

Los resultados de un experimento se muestran en la Figura 3. La línea de linfocitos T murina dependiente de la IL-2, CTLL-2, se utilizó para evaluar la actividad de IL-2 de la proteína de fusión 264 scCTR-IL-2 utilizando un ensayo de proliferación celular no radioactivo. La proteína de fusión 264 scTCR-κ se utilizó en el ensayo como control negativo.

**Ejemplo 10**

Tinción de células pulsadas con péptidos con la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2 demuestra un scTCR funcional. (de referencia)

Se utilizaron la citometría de flujo y la tinción con inmunofluorescencia para demostrar la unión directa de la proteína de fusión mediante su TCR contra los complejos péptido/HLA-A2 sobre la superficie de la línea celular linfocida B humana T2 (Fig. 4)

A) Tinción de células T2 pulsadas con el péptido 149 o 264 con 0,5 mg (10 mg/ml) de la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2. La proteína de fusión se une específicamente a las células T2 que presentaban el péptido 264 pero no al péptido 149.

B) Las células T2 se pulsaron con 50 mg del péptido 149 o 264. Para evaluar la carga A2 de cada péptido, las células se tiñeron con el mAb BB7.2 (0,05 mg) específico de HLA-A2 después de una incubación durante una noche de las células con el péptido. Los resultados de estos experimentos muestran un nivel equivalente de expresión de superficie de HLA-A2 en células T2 pulsadas con cualquier péptido indicando una unión a HLA-A2 eficaz de ambos péptidos.

**Ejemplo 11**

Conjugación célula-célula mediada específicamente por la proteína de fusión 264 scTCR-IL-2 (de referencia)

En este experimento, las células T2 se pulsaron con cualquiera de los péptidos 149 o 264. Las células CTLL-2 se marcaron con hidrodietidio (HE) y se incubaron durante 20 minutos a TA con un número igual de células T2 marcadas con AM-calceína pulsadas con 50 mg de cualquiera de los péptidos 149 o 264. La Figura 5 muestra la conjugación entre células cuando se añadía 1 mg de proteína de fusión a la mezcla de incubación que contenía células CTLL-2 y células T2 cargadas con péptido 264 (A; 3,25 %). Por el contrario, la formación de conjugado no se observó con la mezcla que incluía las células T2 pulsadas con el péptido 149 (B; 0,88 %). Las muestras de células se lavaron una vez antes del análisis en el citómetro de flujo.

**Ejemplo 12**

Construcción de moléculas de fusión scTCR/IgG (murina), que se habían descrito previamente en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite nº 09/422.375.

Existe el reconocimiento de que la expresión del 145-2CII scSc- Fv solo, es decir no como parte de una molécula sc biespecífica, es muy baja. Sin desear quedar ligados por teoría alguna, el bajo nivel de la expresión de sc-Fv puede ser un factor limitante en la expresión de moléculas biespecíficas. La línea celular de hibridoma 145-2C11 nativa se utilizó como fuente de anticuerpos y las células se transfectaron con scTCR fusionado con la cadena pesada de IgG2b murina (Fig. 12). La línea celular de hibridoma transfectada debería secretar algunas moléculas 145-2C

11/scTCR quiméricas si la IgG de hámster huésped puede emparejarse eficazmente con la cadena pesada de IgG2b murina.

Para clonar el p149scTCR como una fusión con IgG, se mutó primero un sitio de restricción interno EcoRI utilizando mutagénesis dirigida al sitio. En resumen, un par de oligonucleótidos complementarios, KC293 y KC294, se diseñaron para que contuvieran la mutación deseada. La construcción pNAG2 ADN se amplificó por PCR con los cebadores utilizando la ADN polimerasa Pfu. El producto de la PCR resultante se digirió con *DpnI* que digiere la matriz de ADN parental, dejando el ADN mutado intacto. El ADN de scTCR mutado se secuenció y entonces se re-amplificó por PCR con cebadores KC276 y KC268 para generar el fragmento de ADN 5'Nrul-3'EcoRI. El ADN de scTCR mutado se clonó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy para la determinación de la secuencia de ADN. El ADN scTCR correcto se digirió por restricción y se clonó en el vector de expresión en células de mamífero pSUN7 para crear la molécula de fusión p149 scTCR/IgG.

Construcción de la molécula de fusión DO 11.10 scTCR/IgG

La construcción pKC60 ADN se re-amplificó por PCR con los cebadores KC275 y KC268 para generar el fragmento de ADN 5'Nrul-3'EcoRI. El fragmento scTCR se clonó en el Sistema de Vector pGEM-T Easy para la determinación de la secuencia de ADN. El ADN de scTCR correcto se digirió por restricción y se clonó en el vector de expresión pSUN7 en células de mamífero para crear la molécula de fusión DO 11.10 scTCR/IgG (véase las Figura 12A/12B).

Construcción del vector de expresión de IgG2b murina

La construcción del vector de expresión de IgG2b (cadena pesada) murina fue de la siguiente manera. El armazón del vector era el plásmido pCDNA3 (Invitrogen). El plásmido se cortó con HindIII y XhoI y un fragmento de ADN del "poliengarce de cadena ligera" se insertó para crear el "vector de cadena ligera" de partida pCDNA3.LCPL. Este engarce contenía los sitios de restricción HindIII, KpnI, ClaI, PmlI, EcoRV, XmaI, BamHI, y XhoI para facilitar las siguientes etapas de clonación. Un fragmento de ADN SmaI-BclI que contenía un líder de cadena ligera, un fragmento genómico de cadena ligera kappa anti-CKMB de ratón, y una 3' UTR se clonó en los sitios EcoRV-BamHI de pCDNA3.LCPL. Se llevó a cabo entonces la mutagénesis para eliminar un sitio Nrul MluI, y BstBI y para introducir un sitio NheI y BamHI para crear el plásmido pCDNA3mut.LCPL.LCVK.

El "vector de cadena pesada" pCDNA3mut.HCPL se construyó a partir del plásmido pCDNA3mut.LCPL.LCVK reemplazando la región de expresión de la cadena ligera (HindIII-XhoI) con el "poliengarce de cadena pesada" que consiste en los sitios de restricción HpaI, BspEI, EcoRV, KpnI, y XhoI. Este plásmido se digirió con EcoRV y KpnI. Un fragmento de ADN digerido con SmaI KpnI que contenía un líder de cadena pesada, y un fragmento genómico de cadena pesada de IgG2b anti-CKMB de ratón (véase Near y col., Molecular Immun., 1990) se ligó entonces en el plásmido digerido con EcoRV-KpnI. Un fragmento de oligonucleótido KpnI-Sall que contenía un 3' UTR y un sitio NotI corriente arriba del sitio Sall se clonó posteriormente en el plásmido digerido con KpnI-XhoI (inactivando el sitio XhoI) para crear el plásmido pCDNA3mut.HCPL.HCV2b, también conocido como el vector de expresión pSUN7 de IgG2b murina (Fig. 13).

### Ejemplo 13

Construcción de moléculas de fusión scTCR/IgG (humana) (Clonación de scTCR 264 en pJRS355 y expresión como una IgG1 de fusión).

Una preparación de ADN del 264 scTCR proporcionado por Kim Card se utilizó como matriz para la amplificación por PCR de esta construcción de scTCR. Se llevó a cabo la re-amplificación del scTCR utilizando el conjunto de cebadores de 264 TCRI y KC268. La secuencia nuevamente diseñada 264 TCRI se lee de la siguiente manera, 5'-TTTCgTACgTCTTgTCCCAgT-CAGTgACgCAgC-3' SEQ ID NO: 3. Este oligonucleótido se había diseñado con un sitio de endonucleasa *Bsi* *WI* y un líder B6.2. Se utilizó una polimerasa ExTag de Takara en la reacción de amplificación siguiendo el protocolo de PCR convencional. El perfil de amplificación era el siguiente: 96 □C/ 2 min durante 1 ciclo; 96 □C/30 s, 62 □C/15 s, 72 □C/30 s durante 5 ciclos; y 96 □C/30 s, 68 □C/1 min durante 30 ciclos. La banda de ADN de PM apropiado (~1,3 kb) se purificó en gel siguiendo el protocolo de Clonotech y se clono en el vector pGEM-T Easy de Promega. Después de la ligadura y la transformación en células XL1-Blue, se escogieron seis clones y se exploraron por PCR diagnóstica utilizando dos cebadores, KC285 y KC288, proporcionados por Kim Card. Cinco clones de los seis, producían una banda de ADN con el PM apropiado. Se llevó a cabo el análisis de secuencia de ADN en dos clones, scTCR264/pGem A y B, encontrando que cada clon era el correcto. Las reacciones de digestión doble (*Bsi* *WI* y *Eco* *RI*) se llevaron a cabo para los clones A y B. Los fragmentos de ADN apropiados se purificaron y se agruparon. El 264 scTCR se clonó en un vector de ADN pJRS355 preparado previamente. Después de la ligadura y la transformación en células XL1-Blue, se escogieron dos colonias (A2 y B1). Una digestión *A*/*w* *NI* de su ADN presentaba el patrón de restricción apropiado. La transfección transitoria utilizando el ADN A2 producía una molécula 264 scTCR/IgG1 como se determinó utilizando un ensayo ELISA con anticuerpo específicos contra el TCR y contra el isotipo IgG1.

### Ejemplo 14

Demostración de los efectos antitumorales del TCR modificado *in vitro*

En el ejemplo 11, los inventores demostraron que la proteína de fusión TCR/IL-2 capaz de mediar la conjugación entre un linfocito T y una célula presentadora de antígenos pulsada con el péptido correcto. Ahora los inventores estaban interesados en si el entrecruzamiento mediado por la proteína de fusión da como resultado la destrucción de una célula diana. Para determinar si además este es el caso, los inventores utilizaron un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro*. En resumen, las células efectoras se generaron a partir de esplenocitos murinos aislados y se cultivaron durante tres días a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub> en presencia de estimulación con IL recombinante humana (50 ng/ml) y mAb anti CD3h (145-2C11; 10 ng/ml). Después de tres días en cultivo con estimulación, se llevó a cabo la doble tinción de células utilizando mAb anti-CD8 y anti-CD25 y citometría de flujo. La detección de una población positiva es indicativa de la generación satisfactoria de CTL efectores.

El ensayo de citotoxicidad celular se lleva a cabo utilizando células diana marcadas (por ejemplo, células T2 pulsadas con un péptido, distintos carcinomas) con colorante calceína-AM. Las células vivas (dianas) incorporan el colorante, y entonces se lavan y se añaden a una placa de 96 pocillos que contenían las células efectoras y la proteína de fusión TCR/IL-2 o proteínas de control positivo IL-2 y TCR- $\kappa$  de fusión, respectivamente. Las relaciones de célula efectora respecto a diana generalmente serán de 5:1, 10:1 y 20:1. Los componentes de ensayo se incuban entonces durante 2 a 4 horas a 37 °C y se mide la liberación de calceína-AM en el sobrenadante del cultivo. Se mide o se compara la liberación específica de calceína-AM con el control no específico de calceína-AM liberada espontáneamente.

### Ejemplo 15

Demostración *in vivo* de efectos antitumorales de TCR modificados.

Con el fin de ensayar la capacidad de la proteína de fusión TCR/IL-2 para facilitar la eliminación de tumores humanos que expresan naturalmente A2 y p53, los inventores utilizaron un modelo en el que dichos tumores se establecen en ratones desnudos y SCID. Este modelo también se había utilizado en el laboratorio del Dr. Sherman para ensayar la eficacia de clones de linfocitos T e inmunocitocinas dirigidas contra tumores humanos. Los tumores que se sabe que expresan p53 y que van a destruirse específicamente por el CTL específico de 264 se ensayarán en cuanto a su capacidad para crecer en ratones desnudos y SCID. Los candidatos incluyen MDA-238, BT549, MCF-7, Caski (cáncer de cuello uterino), y células HepG2. Las células ( $1 \times 10^6$ ) se implantarán por vía subcutánea en ratones desnudos y SCID y se permitió que se establecieran durante 7 días antes del tratamiento. Inicialmente, los inventores determinaron para cada construcción bajo evaluación, si el crecimiento tumoral se inhibirá cuando los ratones recibían la molécula de fusión TCR-IL-2 sola. Aunque los inventores anticipaban que los linfocitos T serían necesarios como células efectoras para la eliminación del tumor, otras células linfoides de los ratones desnudos y SCID pueden tener una función efectora debido a la filtración que pueden desencadenarse por la proteína de fusión, y esto podría inhibir el crecimiento tumoral. Esto es particularmente cierto en la presencia de moléculas de anticuerpo biespecífico que tiene Fc $\gamma$  o citocinas capaces de estimular componentes no linfoides del sistema inmunitario innato. Una vez que los inventores determinaron la capacidad de la proteína de fusión para afectar el crecimiento tumoral, los inventores ensayaron diferentes poblaciones de linfocitos T en cuanto a la función efectora. Los experimentos previos en el modelo de tumor murino proporcionará la información necesaria para decidir si se suministrarán linfocitos T intactos o activados. Para los fines de control, los inventores suministraron linfocitos T activados como efectores en los ratones sin el tratamiento concurrente de la fusión TCR-IL-2.

### Ejemplo 16

Preparación de conjugados de doxorubicina (Dox) y caracterización *in vitro* de propiedades anti-tumorales (de referencia)

El propósito de este ejemplo es desarrollar un inmunoconjugado utilizando el 264 sc TCR- $\kappa$  y un fármaco citotóxico tal como Doxorubicina. La Dox, un miembro de la familia de antraciclinas de fármacos, es uno de los fármacos anticáncer más potentes que se conocen pero su aplicación clínica se ha limitado debido a su cardio-toxicidad. Un intento de superar la cardio-toxicidad ha sido unir la Dox a una molécula de vehículo, tal como un mAb anti-tumoral, para suministrar el fármaco específicamente a los sitios tumorales. Los resultados de los estudios en modelos pre-clínicos han demostrado que los inmunoconjugados-Dox pueden destruir células tumorales más eficazmente y con menos toxicidad que las dosis equivalentes del fármaco libre.

En este ejemplo, los inventores prepararon y purificaron un conjugado 264 scTCR-Dox y después se llevaron a cabo varios estudios con el inmunoconjugado para caracterizar su actividad de destrucción del tumor *in vitro* e *in vivo*. Primero, se determinó el número óptimo de moléculas que se acoplan a la proteína de fusión scTCR- $\kappa$ . La cantidad de Dox internalizada por una célula tiene una influencia directa sobre la tasa y eficacia de la destrucción tumoral. Por lo tanto, si se asume que el número de dianas péptido/MHC presentadas en la célula tumoral es limitante, entonces el acoplamiento de un número cada vez mayor de moléculas Dox en el scTCR puede ser deseable. Sin embargo la estabilidad de la unión entre el scTCR y el grupo Dox tiene que ser suficientemente alta para evitar la citotoxicidad celular no específica *in vivo* asociada con la dispersión de la Dox. Colectivamente, los hallazgos de estos estudios se pueden utilizar para predecir la actuación del conjugado TCR-Dox en estudios pre-clínicos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un complejo de fusión del receptor de linfocito T soluble que comprende un receptor de linfocito T y un polipéptido biológicamente activo conectados por un engarce peptídico, en el que el receptor de linfocito T consiste en el receptor de linfocito T de cadena sencilla 264 (scTCR 264) y en el que el polipéptido biológicamente activo consiste en el dominio constante (Fc) de una IgG1 humana, en el que el receptor de linfocito T es específico para el reconocimiento de un antígeno peptídico que comprende una secuencia peptídica LLGRNSFEV.
2. El complejo de fusión del receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1, en el que el complejo de fusión es un dímero que comprende dos polipéptidos scTCR264-IgG1.
- 10 3. Un procedimiento de preparación de un complejo de fusión del receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una cadena de receptor de linfocito T, o un subfragmento de la misma; proporcionar un polipéptido biológicamente activo que corresponde a una segunda cadena, o subfragmento de la misma; conectar la cadena del receptor de linfocito T y la segunda cadena a un engarce peptídico; y recuperar el complejo polipeptídico de fusión del receptor de linfocito T unido, generando de esta manera un complejo de fusión del receptor de linfocito T.
- 15 4. Una fusión del receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento del cáncer.
5. Una composición terapéutica para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo de fusión del receptor de linfocito T de la reivindicación 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estéril.
- 20 6. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un complejo de fusión del receptor de linfocito T de la reivindicación 1 o 2 que comprende un receptor de linfocito T y un polipéptido biológicamente activo conectados por un engarce peptídico, en el que el receptor de linfocito T tiene un sitio de reconocimiento de unión y el polipéptido biológicamente activo tiene un sitio de reconocimiento de unión diferente.
- 25 7. Un procedimiento *in vitro* para la destrucción de una célula diana que comprende un ligando capaz de unirse específicamente a un receptor de linfocito T, comprendiendo el procedimiento: a) poner en contacto las células diana con un complejo de fusión del receptor de linfocito T soluble de la reivindicación 1 o 2, b) formar un complejo de unión específico entre el ligando en las células diana, el complejo de fusión del receptor de linfocito T y las células efectoras que reconocen el polipéptido biológicamente activo, y c) destruir las células diana con las células efectoras.

Proteína de fusión constante 264 scTCR- $\kappa$

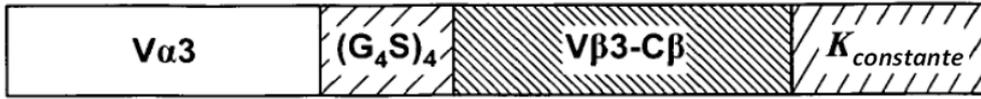


FIG. 1A



FIG. 1B

FIG. 1C

*Proteína de fusión 264 scTCR-IL2*



FIG. 2A

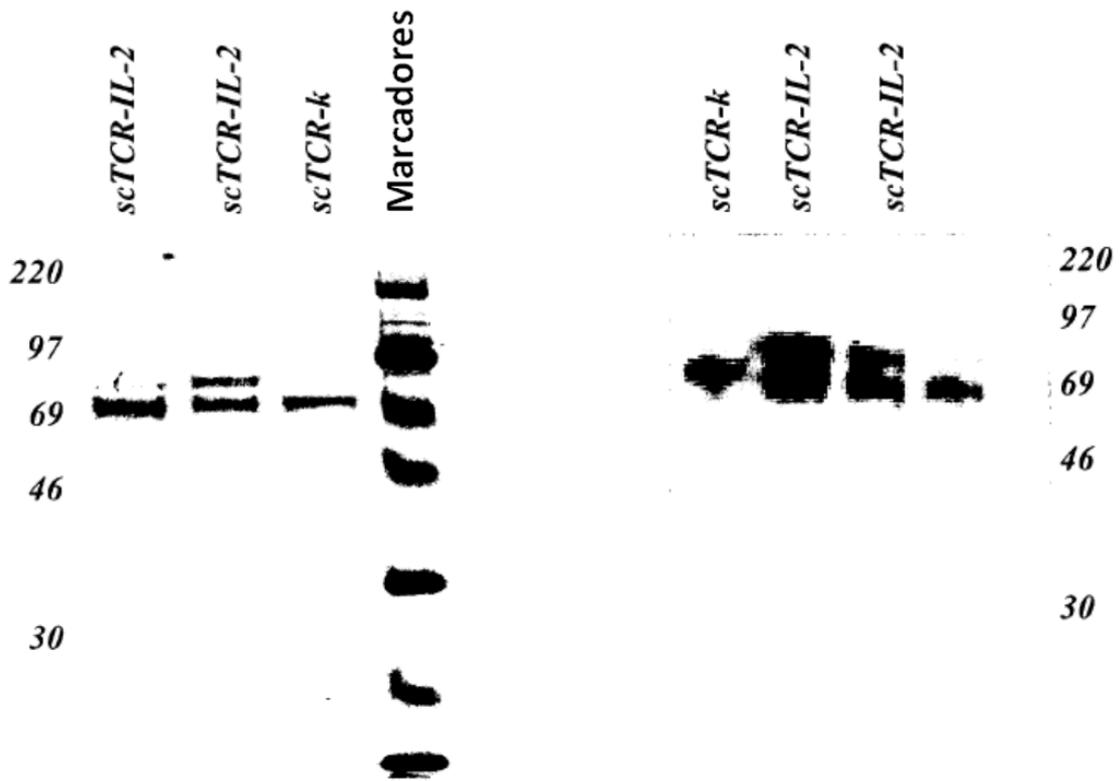


FIG. 2B

FIG. 2C

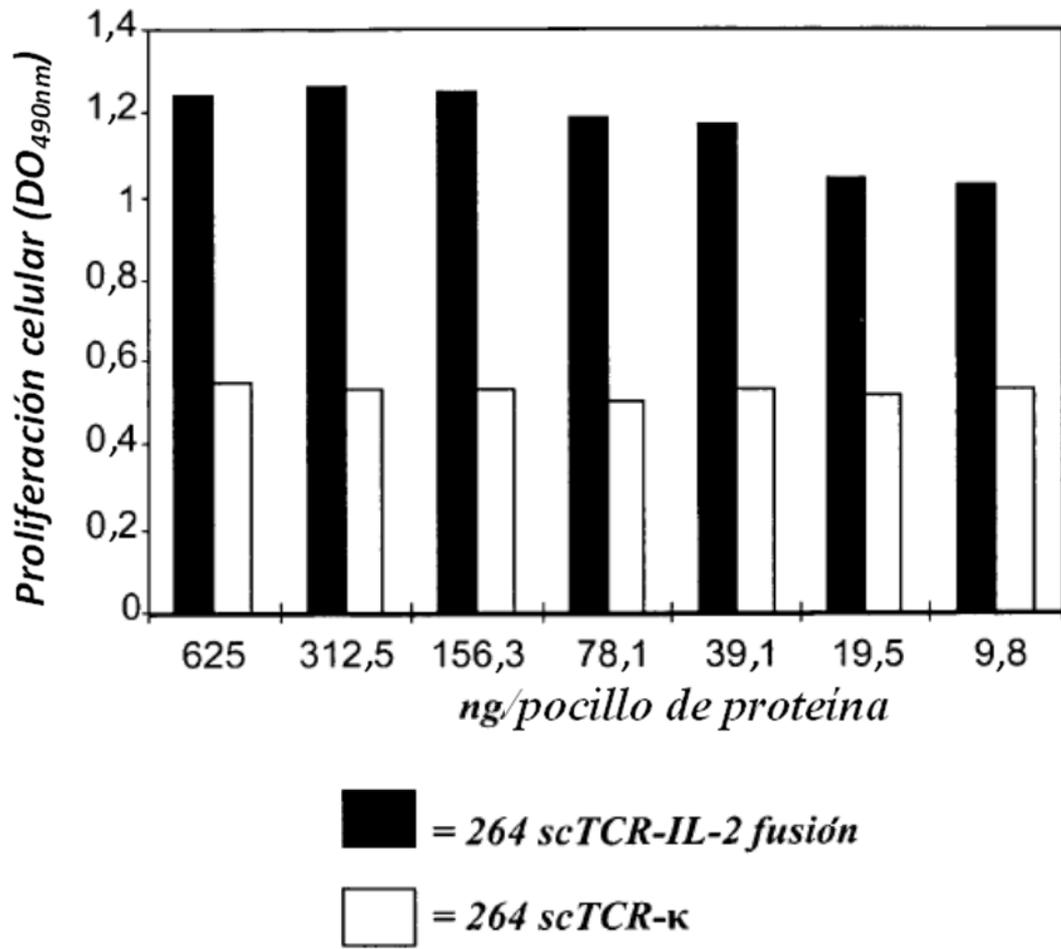


FIG. 3

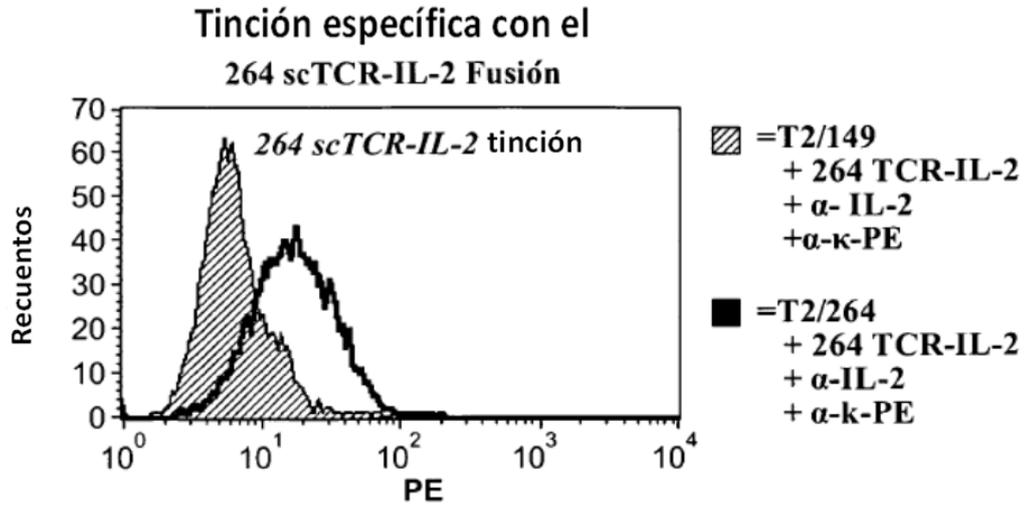


FIG. 4A

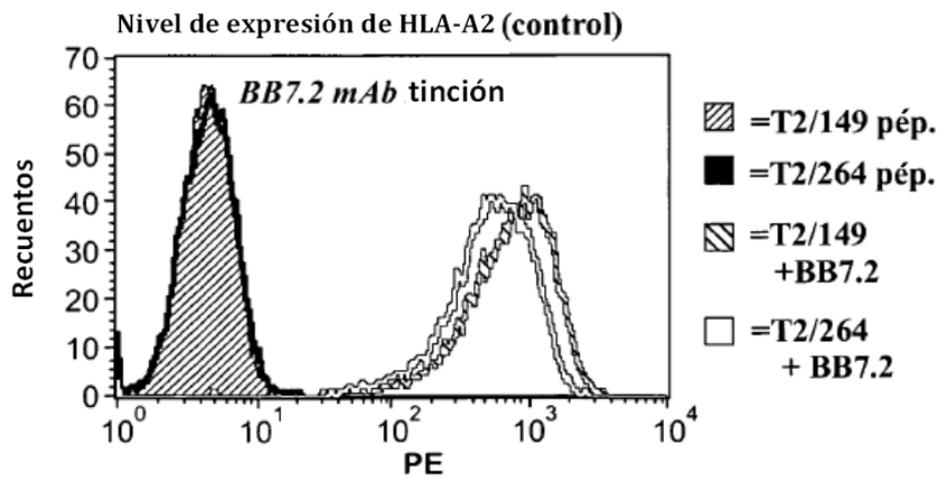
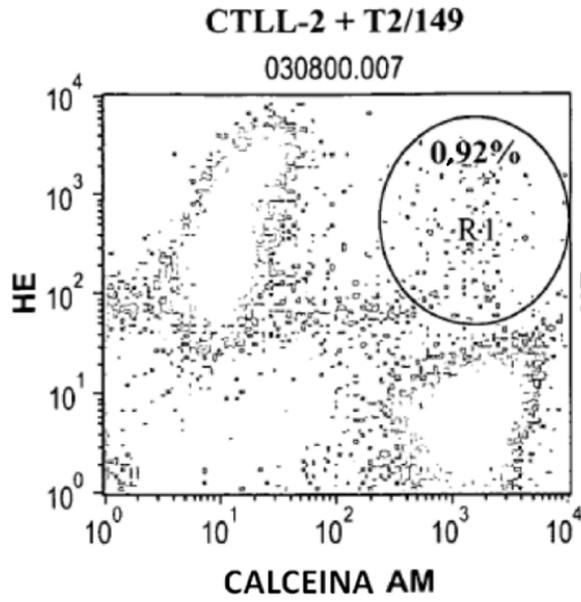
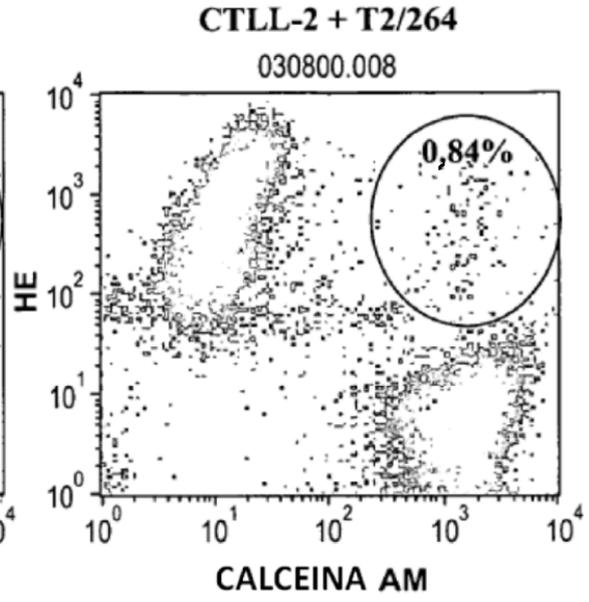


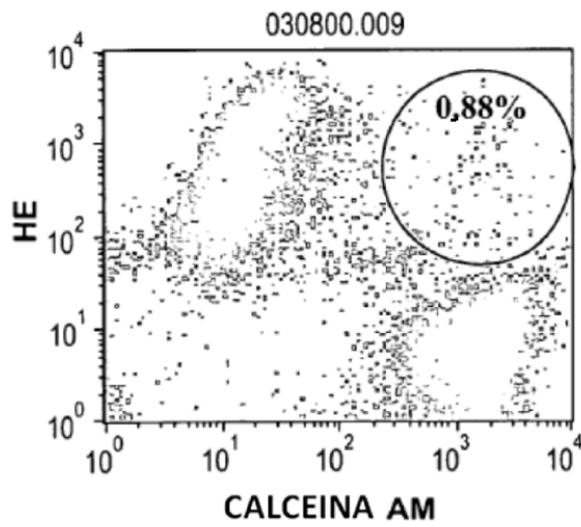
FIG. 4B



**FIG. 5A**

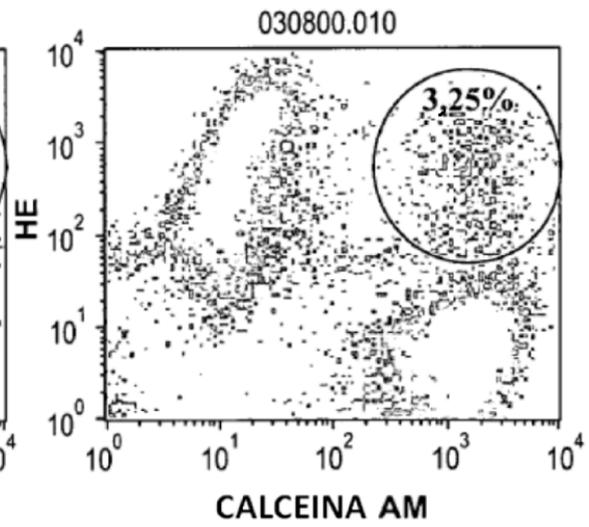


**FIG. 5B**



**CTLL-2  
+ 264 TCR-IL2 + T2/149**

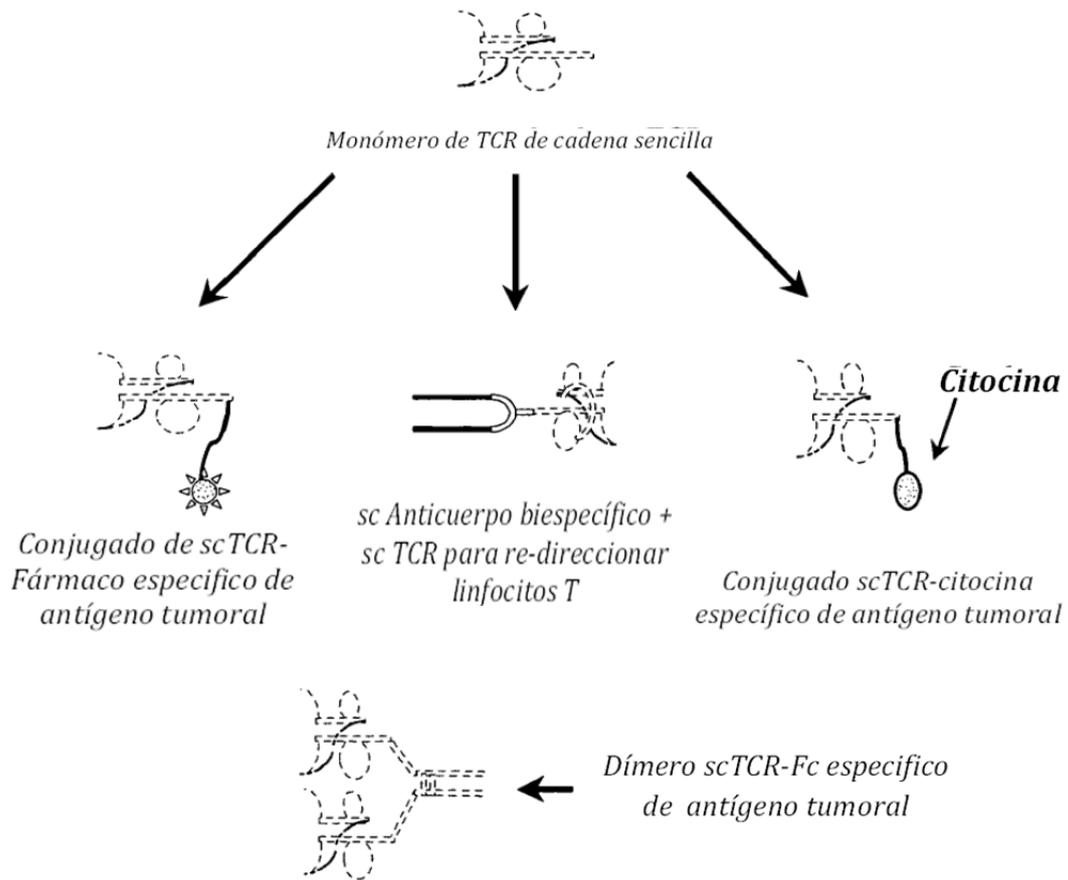
**FIG. 5C**



**CTLL-2  
+ 264 TCR-IL2 + T2/264**

**FIG. 5D**

**Formatos para agentes terapéuticos basados en el receptor de linfocito T**



**FIG. 6**

*Destrucción celular tumoral por suministro de fármacos dirigidos por scTCR*

---

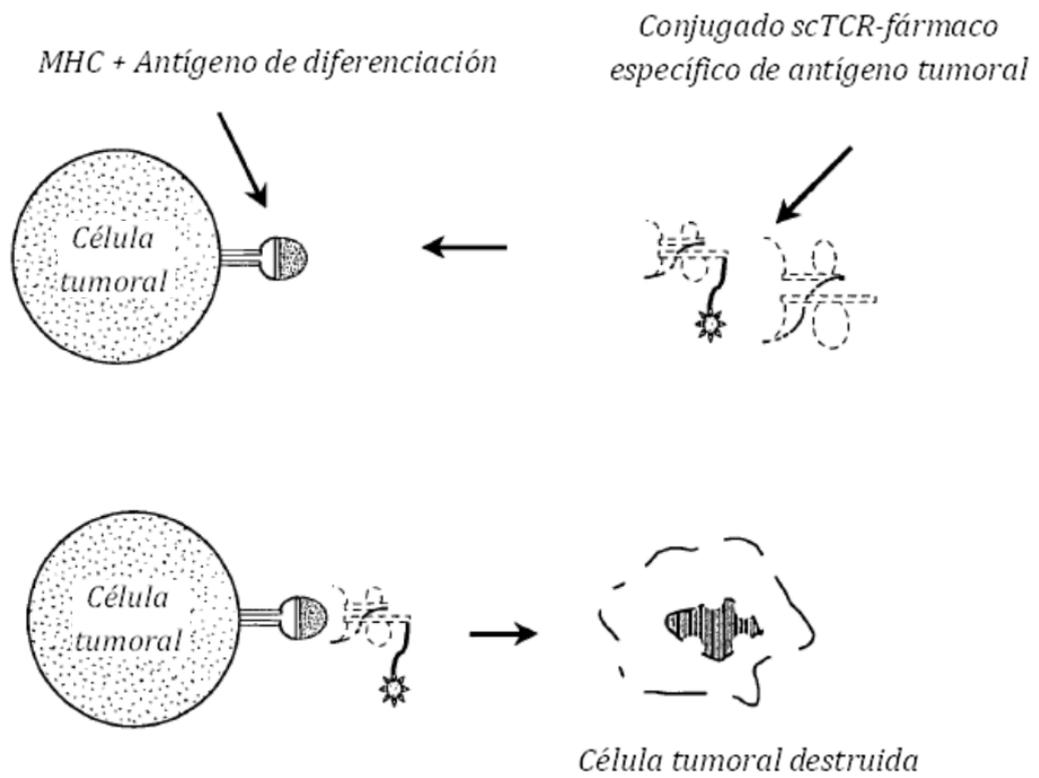
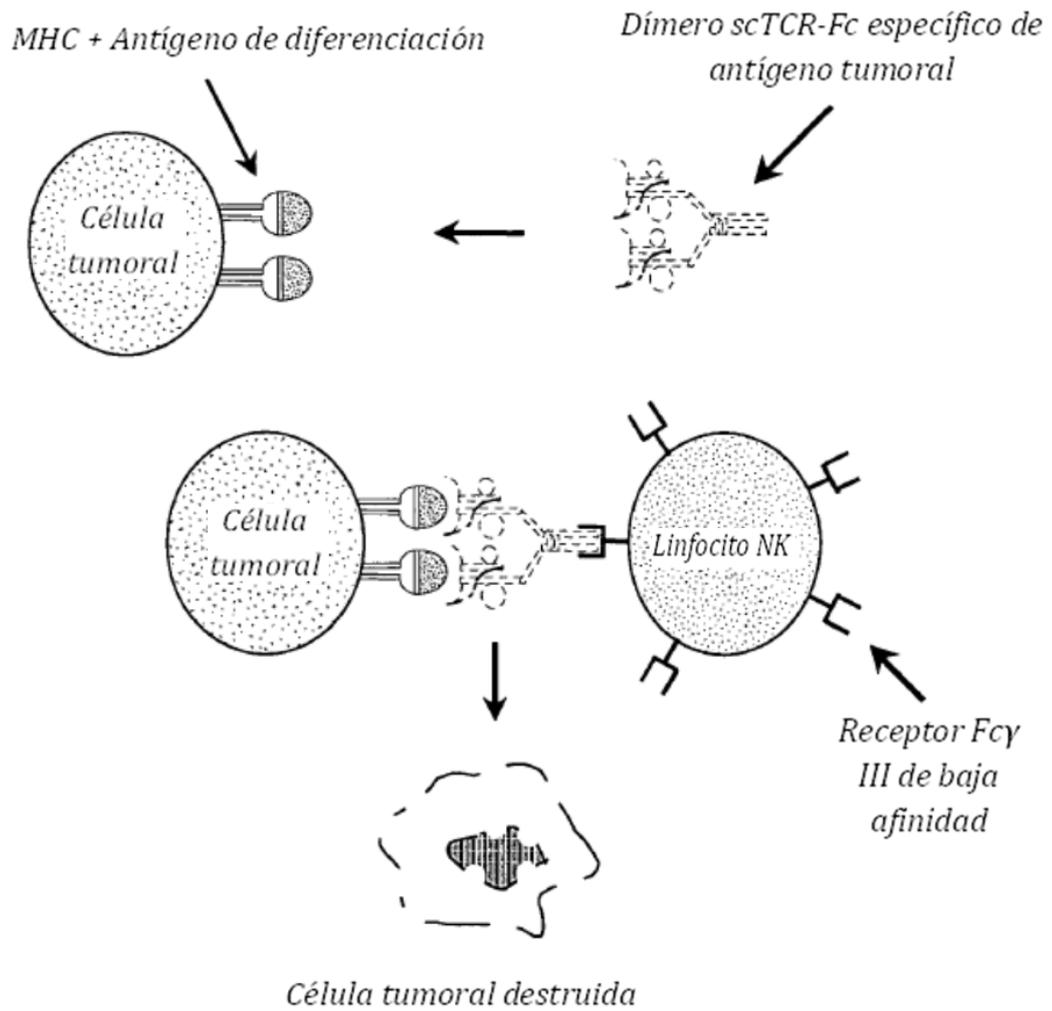


FIG. 7

*Destrucción celular tumoral por citotoxicidad mediada por células dependiente de Fc*

---



**FIG. 8**

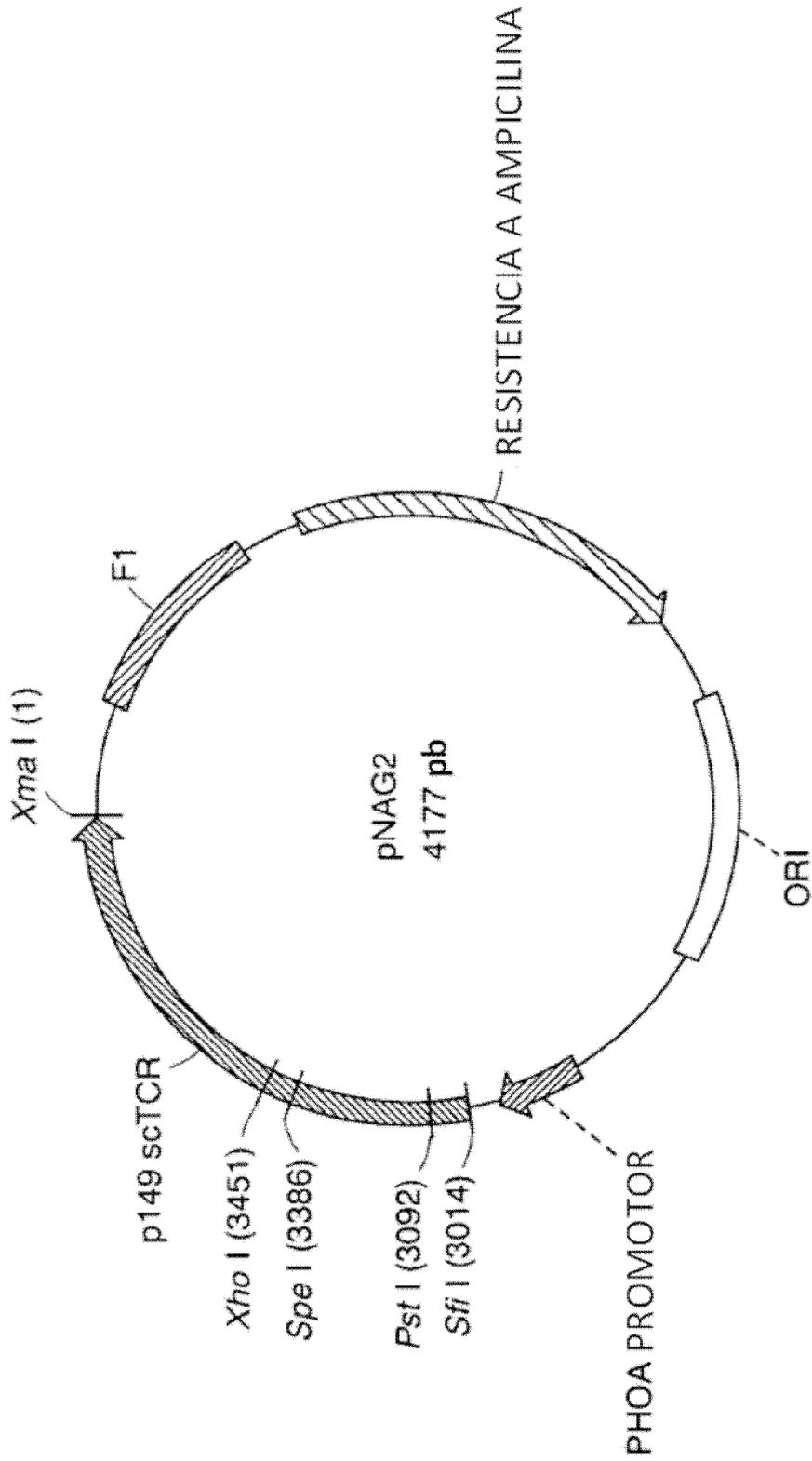


FIG. 9

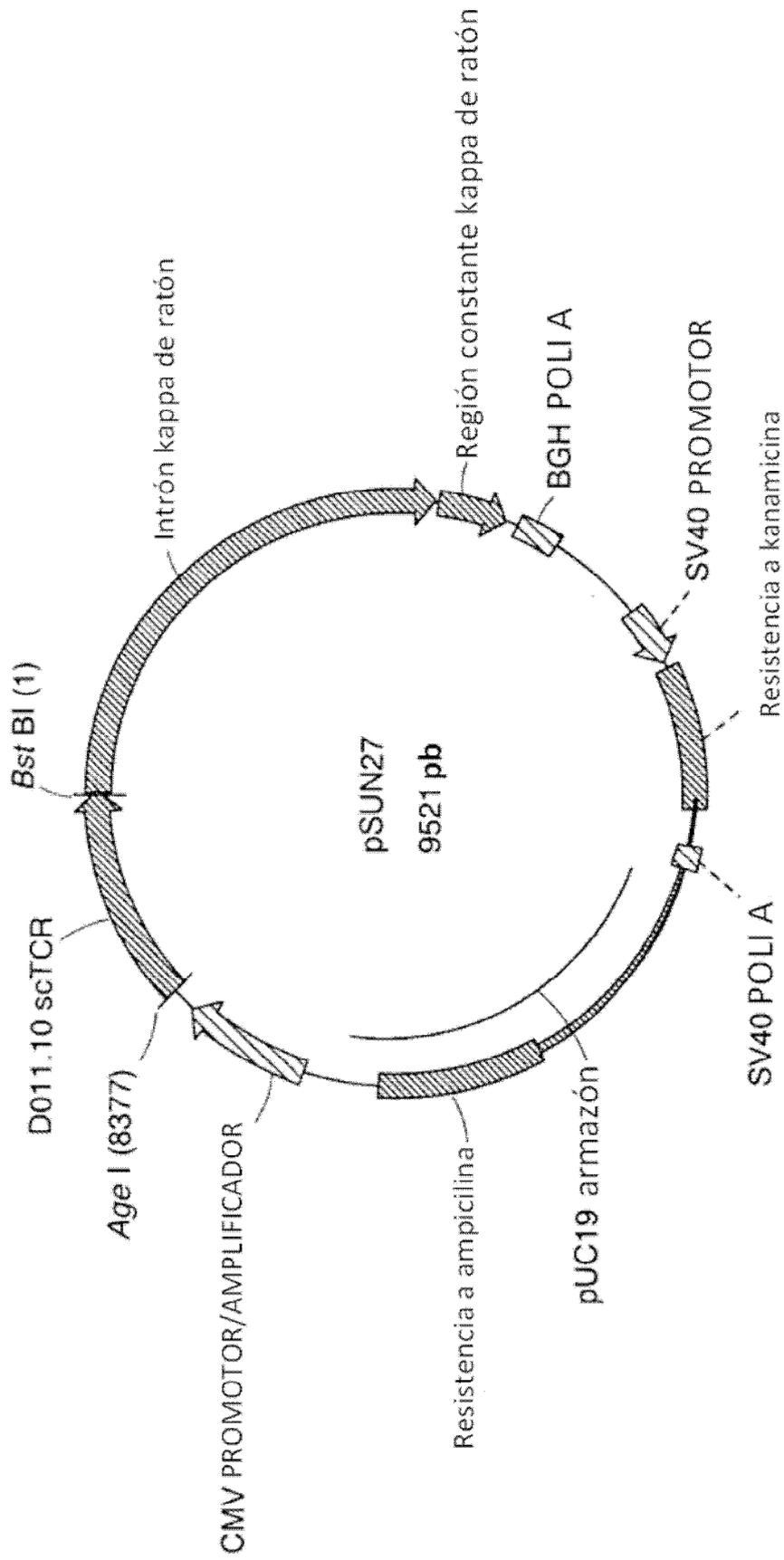


FIG. 10

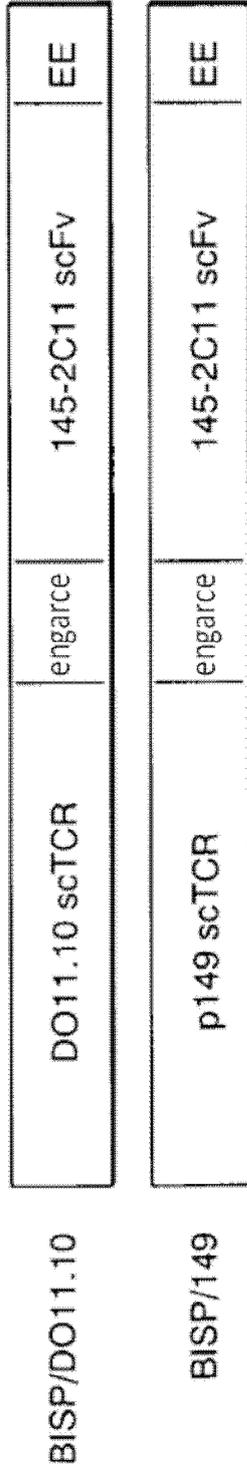


FIG. 11

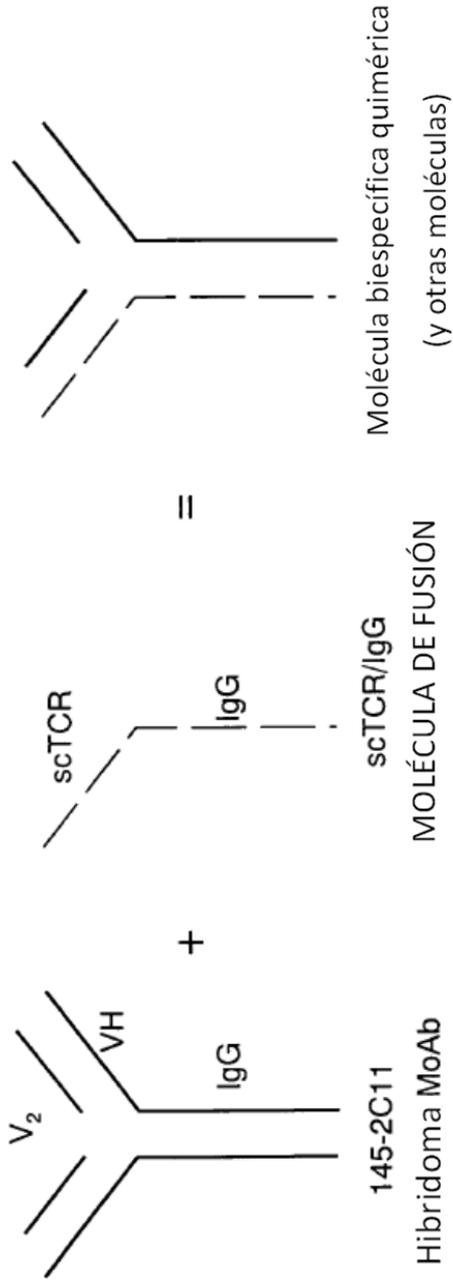


FIG. 12A



FIG. 12B

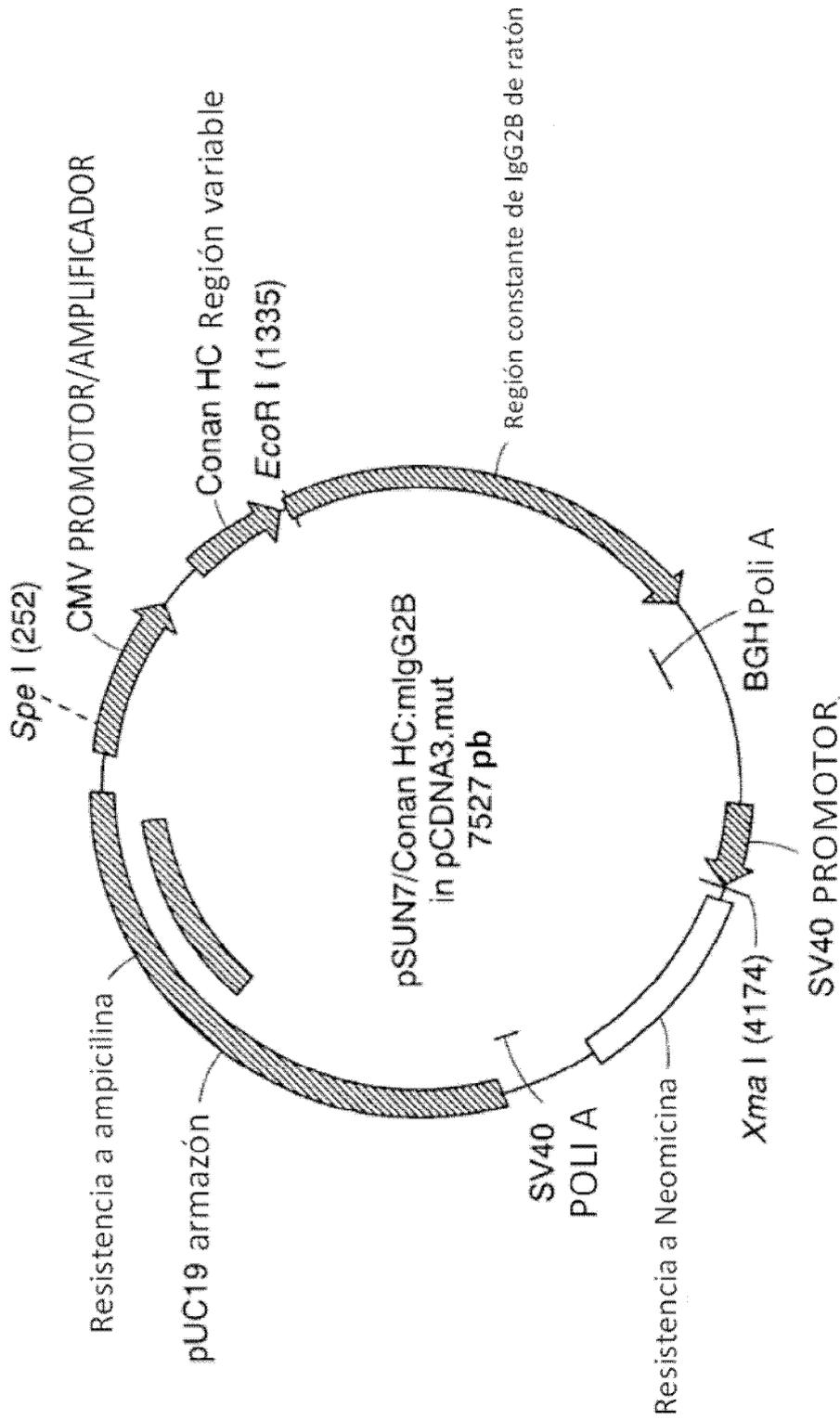


FIG. 13