

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 926**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/17** (2015.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2004** **E 14196412 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2913340**

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

30 Prioridad:

**06.12.2003 GB 0328363**

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

**16.11.2018**

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)  
Level 12 Electrical and Electronic Engineering  
Building Imperial College  
London SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 689 926 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Receptor de células T específico para el antígeno del tumor de Wilms

La presente invención se refiere a moléculas terapéuticamente útiles, en particular a receptores de células T (TCRs) que pueden introducirse en las propias células T del paciente para dirigir a las células T a destruir células cancerosas dentro del paciente, particularmente células cancerosas que expresan el antígeno-1 del tumor de Wilms. (WT1).

La inclusión o discusión de un documento publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o que es de conocimiento general común. Todos los documentos a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia.

Existe evidencia de que los linfocitos T citotóxicos antitumorales (CTL) juegan un papel importante *in vivo*. Se ha demostrado que los CTL reactivos frente a tumores median en la regresión del tumor en modelos animales (Kast et al (1989) Cell 59, 603-614) y en el hombre (Kawakami et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462; Dudley (2002) Science 298, 850-854). Al igual que con todos los tipos de terapia antitumoral, un problema que debe superarse es que la terapia debe destruir o inactivar las células tumorales diana en una medida útil, pero que la terapia no debe destruir o inactivar las células no tumorales en una medida perjudicial. En otras palabras, es deseable que la terapia sea selectiva para células tumorales en una extensión beneficiosa.

Gran parte del trabajo actual sobre la inmunoterapia del cáncer hace uso del hecho de que determinados tumores expresan polipéptidos que no se expresan en el tejido equivalente no tumoral, o hace uso del hecho de que el tumor expresa una forma mutante de un polipéptido que no es expresado en el tejido no tumoral. Sin embargo, no siempre es posible identificar polipéptidos en un tumor que caiga dentro de esta categoría y, así, se han identificado otros polipéptidos diana que pueden formar la base de un enfoque inmunoterapéutico.

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

Como se describe en la solicitud de patente WO00/26249 de la misma solicitante que la presente, utilizando un enfoque no convencional que emplea CTL alo-MHC-restringidos, los autores de la invención identificaron epítopos peptídicos en el polipéptido WT1 que pueden ser presentados por moléculas HLA-A2 clase I y se muestran en la superficie de células tumorales que expresan estas proteínas endógenamente. Individuos que responden negativamente a HLA-A2 se utilizaron como fuente de CTL específicos para péptidos presentados por molécula HLA-A2 clase I, y este enfoque permite la identificación de péptidos presentados por HLA-A2, independientemente de la posible tolerancia de CTL autólogos.

Uno de los epítopos peptídicos descritos en el documento WO00/26249 es RMFPNAPYL (que también se ha denominado pW126 por parte de los autores de la invención), y estos han descrito previamente un CTL que es capaz de: destruir dianas HLA-A2 positivas recubiertas con el péptido pW126 derivado de WT1 (Gao et al (2000) Blood 95, 2198-2203); matar células de leucemia positivas para HLA-A2 recientes que expresan WT1 (Gao et al (2000) Blood 95, 2198-2203); matar células progenitoras de CFU de leucemia positivas para HLA-A2 (Gao et al. (2000) Blood 95, 2198-2203; Bellantuono et al. (2002) Blood 100, 3835-3837); matar células madre LTC-IC de leucemia positivas para HLA-A2 (Bellantuono et al (2002) Blood 100, 3835-3837); matar células iniciadoras de la leucemia NOD/SCID positivas para HLA-A2 (Gao et al (2003) Transplantation 75, 1429-1436); y no matan células madre hematopoyéticas susceptibles de injertar NOD/SCID positivas para HLA-A2 (Gao et al (2003) Transplantation 75, 1429-1436). Sin embargo, ninguna de estas publicaciones proporciona información molecular concerniente al TCR presente en el CTL, y la línea de CTL particular mencionada en las publicaciones no se ha puesto a disposición del público de ninguna manera, por lo que se desconoce la estructura del TCR y no pudo ser derivada por la persona experta (ya que la línea CTL no estaba disponible al público).

Los autores de la presente invención han clonado ahora un TCR que es específico para RMFPNAPYL, un péptido de WT1 que es presentado por moléculas HLA-A2 de clase I, y han demostrado que la introducción del TCR en células T CD4 positivas o CD8 positivas confiere a las células T diseñadas la capacidad de matar las células cancerosas que expresan WT1 endógenamente. Además, los autores de la invención han definido la estructura

molecular del TCR, han identificado las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y describen cómo hacer TCRs recombinantes que se cree que conservan la misma especificidad de la molécula precursora.

Los TCRs pueden ser útilmente introducidos en una célula T derivada de un paciente (preferiblemente un paciente positivo para HLA-A2) que padece un tumor maligno (en donde las células tumorales del paciente expresan WT1), y la célula T diseñada es introducida en el paciente para combatir el tumor maligno. En particular, se propone tomar células T de pacientes con cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, otros cánceres sólidos o leucemia, transducirlos *in vitro* con un vector retroviral que contiene los genes de TCR, y volver a infundir las células T transducidas en los pacientes. La credibilidad de este enfoque se confirma por la demostración en los Ejemplos de que los genes de TCR específicos para WT1 pueden transferirse a células T humanas, que los genes aumentan la expresión de TCR en la superficie de células T receptoras, que las células T receptoras pueden matar células diana positivas para HLA-A2 recubiertas con el péptido pWT126 y células tumorales positivas para HLA-A2 que expresan WT1 endógenamente.

La estructura general de los receptores de células T (TCRs), su estructura de dominio y la organización de los genes que los codifican es bien conocida, por ejemplo, véase el Capítulo 11 en *Immunology*, segunda edición (1994), por Janis Kuby, W H Freeman & Co, Nueva York, EE.UU., y García et al (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17, 369-397. Una clase común de TCRs naturales es la clase  $\alpha\beta$  en la que los TCR se componen de una cadena alfa separada y una cadena beta separada que forman un heterodímero que está asociado a la membrana de la célula T. Cada una de las cadenas alfa y beta está formada por regiones que, en orden desde el extremo N al extremo C, son una secuencia conductora, una región variable, una región constante, una secuencia de conexión, una región de transmembrana y una región de cola citoplásmica (véase la Figura 14 para una representación gráfica de la estructura de  $\alpha\beta$  TCR). La región variable de la cadena alfa se denomina la región V $\alpha$  y la región variable de la cadena beta se denomina la región V $\beta$ . De manera similar, la región constante de la cadena alfa se denomina la región C $\alpha$  y la región constante de la cadena beta se denomina la región C $\beta$ . El trabajo del  $\alpha\beta$  TCR es reconocer y unirse a un péptido presentado en una molécula de HLA de una célula en el cuerpo. En términos generales, el TCR no puede reconocer y unirse al péptido, a menos que sea presentado por una molécula de HLA particular, y el TCR no puede reconocer una molécula de HLA, a menos que presente el péptido específico. Las células T que albergan un TCR específico fijarán como objetivo células que presentan un péptido específico en una molécula de HLA particular en una célula (es decir, un complejo péptido-HLA), y este es el principio principal de la inmunidad basada en células T.

El complejo péptido-HLA es reconocido por las regiones V combinadas de las cadenas alfa y beta del TCR. En particular, son las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las regiones V las que median en el reconocimiento del complejo péptido-HLA. La región V de las cadenas alfa y beta del TCR natural está formada, en orden en una dirección N-terminal a C-terminal, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3, en donde FR representa "región marco" y CDR representa "región determinante de complementariedad". Las FRs y CDRs de las cadenas alfa y beta son diferentes.

A partir de las secuencias de aminoácidos predichas de las cadenas alfa y beta del TCR clonado como se mencionó anteriormente, los autores de la invención han determinado las FRs y CDRs de las cadenas alfa y beta (véanse las Figuras 2 y 4). Con el conocimiento de las secuencias de CDR, es posible producir TCRs quiméricos en los que las CDRs se injertan en regiones marco con las que las CDRs no están asociadas de forma natural, y también es posible producir moléculas de TCR de cadena simple, y en ambos casos las moléculas conservan sustancialmente la misma afinidad de unión para el complejo péptido-HLA que la molécula original, tal como se describe con más detalle a continuación.

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

CDR1 $\alpha$ : SSYSPS

CDR2 $\alpha$ : YTSAATL

CDR3 $\alpha$ : VVSPFSGGGADGLT, o que comprenden o consisten en SPFSGGGADGLT y la porción de cadena beta contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\beta$ : DFQATT

CDR2 $\beta$ : SNEGSKA

CDR3 $\beta$ : que comprende SARDGGEG o RDGGEGSETQY, molécula de TCR que es capaz de unirse a un complejo de HLA-A2/RM-FPNAPYL.

Cabe señalar que en algunos sistemas de nomenclatura, la CDR3 de las cadenas  $\beta$  puede definirse como más larga que en el sistema de nomenclatura utilizado en la base de datos de Immunogenetics (IMGT) descrita más adelante. Además, en algunos sistemas de nomenclatura, la CDR3 de las cadenas  $\alpha$  puede definirse como más corta que en

el sistema IMGT. De manera similar, la porción constante puede incluir o no residuos marco que flanquean la región CDR3 en los diferentes sistemas de nomenclatura.

Por lo tanto, en una realización que utiliza el sistema IMGT, CDR3 $\alpha$  puede tener la secuencia de aminoácidos VVSPFSGGGADGLT y la porción constante incluye la secuencia de aminoácidos de marco FGKGTLLIIP (véase la Figura 5).

En otra realización, utilizando el sistema de nomenclatura de García (García et al (1999) Ann. Rev. Immunol. 17, 369-397, incorporado aquí como referencia) CDR3 $\alpha$  comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SPFSGGGADGLT, la región marco inmediatamente C-terminal a esto tiene la secuencia de aminoácidos FGKGTLLIIP y la región constante comienza con la secuencia de aminoácidos YIQNP... (véase la Figura 5).

En una realización que utiliza el sistema de nomenclatura IMGT, CDR3 $\beta$  puede tener la secuencia de aminoácidos SARDGGEG y la región constante inmediatamente C-terminal a esto incluye la secuencia de aminoácidos de marco SETQY... (Figura 4).

En otra realización, utilizando el sistema de nomenclatura de García como antes, CDR3 $\beta$  comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RDGGEGSETQY y la región marco inmediatamente C-terminal a esto tiene la secuencia de aminoácidos FGPGTRLLVL y la región constante C-terminal inmediata comienza con la secuencia de aminoácidos EDLKN... (véase la Figura 6).

Se apreciará que la persona experta puede diseñar y sintetizar fácilmente TCRs de acuerdo con la invención utilizando cualquiera o cualquier sistema de nomenclatura, siempre que la región marco (es decir, la región no reemplazada por las CDRs) sea compatible con las CDRs como es bien conocido en la técnica.

El código estándar de aminoácidos de una letra IUPAC se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva. Para evitar dudas, una referencia a una CDR "particular" o "dada" significa cualquier CDR con la secuencia de aminoácidos dada anteriormente o en donde hasta tres aminoácidos han sido reemplazados por otro residuo aminoácido.

Por "molécula de TCR" los autores de la invención incluyen cualquier molécula que contenga las CDRs dadas y también contenga FRs adecuadamente situadas dentro de la molécula, de modo que las CDRs formen un sitio de reconocimiento (sitio de combinación) que sea capaz de unirse a HLA-A2 presentando el péptido RMFPNAPYL (es decir, un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL).

Las moléculas de TCR contienen las secuencias de aminoácidos de CDR precisas tal como se indica anteriormente y en las Figuras 2 y 4 y en las Figuras 5 y 6.

Más adelante se da un método para fabricar y seleccionar moléculas de TCR que tienen CDRs que varían a partir de las secuencias de CDR precisas dadas en las Figuras 2 y 4 y en las Figuras 5 y 6.

Las secuencias de aminoácidos, que incluyen regiones V (y por lo tanto FRs), de numerosas cadenas alfa de TCR y cadenas beta de TCR son bien conocidas en la técnica, algunas de las cuales se describen en la base de datos IMGT (Immunogenetics) en <http://imgt.cines.fr>. Véase también Lefranc (2003) Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77. La base estructural del reconocimiento de células T se revisa en García et al (1999) Ann. Rev. Immunol. 17, 369-397, y la información contenida en el mismo se puede utilizar para diseñar y sintetizar TCRs injertados con CDR (y las CDRs definidas sobre la base de esta nomenclatura se indican anteriormente). Preferiblemente, las FR en las que se injertan las CDR particulares son FRs de cadenas alfa o beta de TCR humanas. Convenientemente, las CDRs de la cadena alfa se injertan en FRs de la cadena alfa y las CDRs de cadena beta se injertan en FRs de cadena beta. Típicamente, las tres CDR en la cadena alfa y las tres CDR en la cadena beta reemplazan, en orden, CDRs en otras cadenas alfa y beta humanas, respectivamente. Véase Lefranc (2003) Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77.

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

La molécula de TCR contiene preferiblemente una porción de cadena alfa que contiene, en orden N-terminal a C-terminal, FR1 $\alpha$ -CDR1 $\alpha$ -FR2 $\alpha$ -CDR2 $\alpha$ -FR3 $\alpha$ -CDR3 $\alpha$ , y una porción de cadena beta que contiene, en orden N-terminal a C-terminal, FR1 $\beta$ -CDR1 $\beta$ -FR2 $\beta$ -CDR2 $\beta$ -FR3 $\beta$ -CDR3 $\beta$  tal como se muestra en las Figuras 2 y 4, respectivamente y en las Figuras 5 y 6, respectivamente. Típicamente, la molécula de TCR contiene la región V tanto de la cadena alfa como de la cadena beta de las cadenas de polipéptidos TCR que se muestran en las Figuras 2 y 4, y en las Figuras 5 y 6.

En una realización preferida, la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Típicamente, la molécula de TCR contiene una cadena alfa que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica mostrada en la Figura 2 (o la Figura 5), y también contiene una cadena beta que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica que mostrada en la Figura 4 (o la Figura 6).

Preferiblemente, la molécula de TCR consiste en una molécula que contiene la cadena alfa completa que se muestra en la Figura 2 y la cadena beta completa que se muestra en la Figura 4. Típicamente, sin embargo, la secuencia conductora se escinde de la cadena alfa y la cadena beta maduras.

5 En una realización adicional, la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta de la molécula de TCR están presentes en la misma cadena polipeptídica. Las moléculas de TCR de cadena simple se describen en Chung et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12654-12658, y los principios descritos en este documento pueden aplicarse fácilmente a la producción de moléculas de TCR de cadena sencilla que contienen las CDRs especificadas.

10 Típicamente, las moléculas de TCR de cadena sencilla contienen los dominios V $\alpha$ , V $\beta$  y C $\beta$  fusionados en la misma cadena polipeptídica, y típicamente en ese orden (desde el extremo N al extremo C). Para la expresión de un TCR de cadena sencilla, es útil proporcionar una construcción que codifique el dominio constante de la cadena alfa de TCR.

15 Una estrategia adicional se describe en Boulter et al (2003) Protein Eng. 16, 707-711, en el que se introduce un nuevo enlace disulfuro entre una treonina en la región constante de la cadena alfa y una serina en la región constante de la cadena beta (reemplazando estos residuos por una cisteína). El enlace disulfuro en el péptido de conexión de TCR se puede separar o puede permanecer en su lugar.

20 Las moléculas de TCR de dos cadenas de la invención (p. ej., las que contienen las cadenas alfa y beta cuya secuencia de aminoácidos se da en las Figuras 2 y 4) o TCRs quiméricos que contienen las CDRs específicas tal como se describió anteriormente pueden utilizarse para introducir la creación de CTL específica para antígenos tal como se describe en más detalle más adelante (mediante el uso de polinucleótidos que codifican las cadenas relevantes). De manera similar, los TCRs de cadena sencilla también se pueden utilizar para este fin, y tienen la ventaja de que no se emparejan con TCRs endógenos. Los TCRs de cadena sencilla también se pueden utilizar como construcciones solubles de una manera similar a los anticuerpos. En este caso, las construcciones de cadena sencilla no contienen una región de transmembrana (véase Chung et al. *supra* y Boulter et al *supra*).

25 Un segundo aspecto de la invención proporciona un polinucleótido que codifica la porción de cadena alfa tal como se define en el primer aspecto de la invención. La presente divulgación se extiende también al caso en el que la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas, y es conveniente (pero no obligatorio) que cada uno de los polipéptidos sea codificado por un polinucleótido separado. Polinucleótidos preferidos que codifican las cadenas alfa y beta se describen en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Alternativamente, los dos polipéptidos pueden ser codificados en el mismo polinucleótido, en cuyo caso las dos regiones codificantes pueden estar enlazadas por una secuencia IRES (sitio de entrada al ribosoma interno), y típicamente tendrían sus propios codones de inicio y terminación susceptibles de traducción. Típicamente, tales construcciones contienen dos promotores, uno para cada una de las cadenas de TCR.

30 Como se comentó anteriormente, en una realización alternativa, la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta están presentes en el mismo polipéptido, en cuyo caso un único polinucleótido puede codificar el polipéptido de cadena sencilla.

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

40 La invención también proporciona un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención. Vectores de expresión de este tipo, cuando están presentes en una célula huésped adecuada, permiten la expresión del o de los polipéptidos de interés. Preferiblemente, el vector de expresión es un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido en una célula de mamífero. Más preferiblemente, el vector de expresión es uno que puede expresar un polipéptido en una célula T, tal como un CTL humano. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor que es activo en tipos de células particulares, y que puede ser controlable (p. ej., inducible).

45 El vector es adecuadamente un vector retroviral que es capaz de transfección en una célula huésped de mamífero tal como una célula T humana. Típicamente, el vector es un vector lentiviral.

50 Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención o un vector de la invención. Si la célula huésped es para producir una molécula de TCR de la invención, contiene uno o más polinucleótidos o vectores que codifican tanto la porción de la cadena alfa como la porción de la cadena beta.

55 La célula huésped puede ser cualquier célula tal como una célula bacteriana, célula de levadura, célula de insecto, célula vegetal o célula de mamífero, y los métodos de introducir polinucleótidos en este tipo de células son bien conocidos en la técnica. Típicamente, células bacterianas, tales como células de *Escherichia coli* se utilizan para la propagación general y la manipulación de los polinucleótidos y vectores de la invención. Se pueden utilizar otras células huésped para expresar las moléculas de TCR de la invención y, en particular, la célula puede ser una célula de mamífero tal como una célula humana. Tal como se describe más adelante en relación con los métodos terapéuticos que utilizan las moléculas de TCR de la invención, es particularmente deseable que la célula huésped

sea una célula T tal como (y preferiblemente) una célula T derivada de un paciente a tratar, típicamente un paciente con un tumor maligno que expresa WT1.

Típicamente, se utiliza un vector retroviral (o, como puede ser el caso, vectores) que codifica la molécula de TCR de la invención en función de su capacidad para infectar linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> humanos maduros y para mediar en la expresión génica: el sistema de vectores retrovirales Kat es una posibilidad preferida (véase Finer et al (1994) Blood 83, 43). Retrovirus anfortróficos de alto título se utilizan para infectar linfocitos T CD8<sup>+</sup> purificados aislados de la sangre periférica de pacientes con tumores siguiendo un protocolo publicado por Roberts et al. (1994) Blood 84, 2878-2889, incorporado en esta memoria como referencia. Anticuerpos anti-CD3 se utilizan para desencadenar las células T de proliferación, lo que facilita la integración retroviral y la expresión estable de los TCRs de cadena sencilla. Una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 puede ser más efectiva que anticuerpos anti-CD3 solos. Otros sistemas adecuados para introducir genes en CTL se describen en Moritz et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4318-4322, incorporado en esta memoria como referencia. Eshhar et al (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90, 720-724 y Hwu et al. (1993) J. Exp. Med. 178, 361-366 también describen la transfección de CTL. El sistema Nuclofactor disponible comercialmente, proporcionado por AMAXA, Alemania, puede utilizarse para transfectar células T. La transducción retroviral de células T CD8<sup>+</sup> humanas se describe en Stanislawski (2001) Nat. Immunol. 2, 962.

Métodos de clonación y manipulación genética son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en manuales estándares tales como Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.

Pacientes que padecen un tumor maligno que expresa WT1 se pueden tratar mediante la introducción de la molécula de TCR de la invención en sus propias células T (o células T de un donante), seguido de la introducción de estas células modificadas genéticamente en el paciente. Por lo tanto, un aspecto adicional de la divulgación proporciona un método para combatir un tumor maligno que expresa WT-1 en un paciente, comprendiendo el método introducir en el paciente una célula T, preferiblemente derivada del paciente, que se modifica para expresar la molécula de TCR de la invención. Típicamente, (1) las células T se obtienen del paciente, (2) un polinucleótido o polinucleótidos que codifica o codifican y es o son capaces de expresar la molécula de TCR de la invención se introducen en las células T *ex vivo* y (3) las células T modificadas genéticamente se introducen en el paciente. Se prefiere particularmente que las células T sean las células T del paciente (es decir, autólogas).

Es particularmente preferido que el paciente sea HLA-A2 positivo.

En otras palabras, la especificidad de la célula T, preferiblemente la célula T autóloga, se modifica mediante la introducción de la molécula de TCR de la invención.

Las células T (por ejemplo, del paciente) se aíslan típicamente de células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) y pueden ser células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Típicamente, las células se activan utilizando un anticuerpo (p. eje, un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28) de modo que se vuelvan receptivas a la transfección, por ejemplo con uno o más vectores retrovirales que codifican las moléculas de TCR de la invención. El médico puede determinar la cantidad de células aisladas, transfectadas y devueltas al paciente.

Las células se pueden tomar de un paciente después de una respuesta clínica, se pueden criopreservar, transfectar y volver a infundir si el mismo paciente recae.

Se puede determinar si un tumor maligno es uno que expresa WT1, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o utilizando técnicas de tinción intracelular para la proteína WT1 (que pueden ser anticuerpos anti-WT1).

El paciente es preferiblemente un paciente humano, aunque en una situación de investigación se pueden utilizar animales. Es particularmente preferido que el paciente sea HLA-A2 positivo. Se puede determinar si un paciente es HLA-A2 positivo o no por métodos bien conocidos en la técnica.

Típicamente, el paciente sufre de uno o más de leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma y sarcoma.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una célula T, preferiblemente una célula T derivada del paciente, que se modifica para expresar la molécula de TCR de la invención en la fabricación de un medicamento para combatir un tumor maligno que expresa WT1 en el paciente.

Tal como se comentó anteriormente, se pueden preparar moléculas de TCR, en las que una o más de las CDRs difieren en la secuencia de las secuencias de CDR precisas dadas en las Figuras 2 y 4. Preferiblemente, moléculas de TCR de este tipo son capaces de reconocer el complejo HLA-A2/RMFPNAPYL más eficazmente que una molécula de TCR con las secuencias de CDR precisas. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona un método de seleccionar una molécula de TCR con unión mejorada a un complejo de HLA-A2/RMFPNAPYL, que comprende (a) proporcionar una molécula de TCR que contiene una porción de cadena alfa y una porción de cadena beta, en donde la porción de cadena alfa contiene tres regiones determinantes de

complementariedad (CDRs):

CDR1 $\alpha$ : SSYSPS

CDR2 $\alpha$ : YTSAATL

CDR3 $\alpha$ : VVSPFSGGGADGLT, o que comprenden o consisten en SPFSGGGADGLT

5 y la porción de cadena beta contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\beta$ : DFQATT

CDR2 $\beta$ : SNEGSKA

CDR3 $\beta$ : que comprende SARDGGEG o consisten en RDGGEGSETQY,

10 en donde al menos un residuo aminoácido en una o más de las CDR dadas se reemplaza por otro residuo aminoácido, (b) determinar si la molécula de TCR se une a un complejo de HLA-A2/RMFPNAPYL con mayor afinidad que una molécula de TCR sin el o los aminoácidos de sustitución, y (c) seleccionar una molécula que se une con mayor afinidad. Preferiblemente, la CDR3 $\beta$  tiene la secuencia de aminoácidos dada anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

15 Las moléculas de TCR con CDRs alteradas pueden prepararse fácilmente mediante métodos de ingeniería genética de proteínas. Por ejemplo, se puede hacer un banco de TCR en el que las regiones CDR de la cadena alfa y/o beta se mutagenizan y las moléculas de TCR se muestran utilizando transducción retroviral en la superficie de un linfoma de células T (véase Kessels et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14578-14583), o en la superficie de una levadura o un bacteriófago. Se puede utilizar un complejo HLA-A2/RMFPNAPYL para seleccionar células o bacteriófagos que se unen al complejo con alta afinidad en virtud de la molécula de TCR que presentan. Moléculas  
20 de TCR que tienen una afinidad de unión mayor (menor  $K_D$ ) de una molécula de TCR con las secuencias de CDR precisas se seleccionan para su posterior estudio.

La invención se describirá ahora con mayor detalle haciendo referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

25 La Figura 1 muestra la secuencia codificante de nucleótidos de la cadena TCR-alfa específica para pWT126 ( $V\alpha$ -1.5).

La Figura 2 muestra la secuencia de proteínas de la cadena TCR-alfa específica para pWT126 ( $V\alpha$ -1.5). Están marcadas la posición de las CDRs, las FRs y la región constante. La secuencia conductora se muestra en negrita.

La Figura 3 muestra la secuencia de codificación de nucleótidos de la cadena de TCR-beta específica para pWT126 ( $V\beta$ -2.1).

30 La Figura 4 muestra la secuencia de proteínas de la cadena de TCR-beta específica de pWT126 ( $V\beta$ -2.1). Están marcadas la posición de las CDR, las FR y la región constante.

35 La Figura 5 muestra la misma secuencia de proteínas que en la Figura 2, pero la posición de inicio de la región constante se indica que está en un lugar diferente. La secuencia de la CDR en esta figura, que comienza detrás de C, se basa en la nomenclatura IMGT (basada en la secuencia primaria). La nomenclatura de García se basa en la estructura y no incluye las VV después de la C (es decir, comienza con SPF...).  $V\alpha$ 8.2 significa segmento de gen alfa 8.2 variable y J45 significa unión del segmento de 45 genes.

40 La Figura 6 muestra la misma secuencia de proteínas que la Figura 4, excepto que CDR3 $\beta$  se indica como más larga y se indica que la posición de inicio de la región constante está en un lugar diferente. La secuencia de la CDR en esta figura, que comienza detrás de C, se basa en la nomenclatura IMGT (basada en la secuencia primaria). La nomenclatura de García se basa en la estructura y no incluye las SA detrás de la C (es decir, comienza RDGG...). J2.5 se refiere a la unión del segmento de 2,5 genes.

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

50 La Figura 8 es un diagrama que muestra la transferencia de genes de TCR retrovirales en células T humanas. Los linfocitos de la sangre periférica se activaron con anticuerpos anti-CD3, IL-2 e IL-7, seguidos 3 días después por transducción con vectores retrovirales que codifican el TCR específico para WT1. La expresión de TCR se controló el día 6 utilizando anticuerpos específicos para el TCR-V-beta 2.1 (presente en el TCR transferido). Células T transducidas simultáneamente muestran el porcentaje de células T humanas no manipuladas que expresan V-beta 2.1. Después de la transducción, tanto las células T CD8-positivas como las CD8-negativas (es decir, CD4-pos)

tienen un porcentaje incrementado de células V-beta 2.1. ADN de V-beta 2.1 y secuencias de aminoácidos se muestran en las Figuras 3 y 4.

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

La Figura 10 muestra que las células T transducidas por TCR (tal como se muestra en las Figs. 8 y 9) se tiñen con tetrámeros HLA-A2/pWT126.

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

15 La Figura 12 muestra que células T CD8-positivas transducidas con TCR, purificadas, matan las células T2 HLA-A2-positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no las células T2 recubiertas con el péptido de control pWT235 que se une a A2. Las células T CD8-positivas también matan las células de leucemia BV173 HLA-A2-positivas que expresan WT1 endógenamente.

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

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

25 La Figura 15 muestra que las células T CD8-positivas transducidas con TCR, purificadas, producen IFN-K después de la estimulación con las células T2 HLA-A2-positivas recubiertas con el péptido pWT126, pero no las células T2 recubiertas con el péptido de control pWT235 que se une a A2. Además, las células T CD8-positivas producen IFN-K después de la estimulación con las células de leucemia BV173 HLA-A2-positivas que expresan WT1 endógenamente.

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

**Programa de SEQ ID Nos.**

- 30 1. RMFPNAPYL  
 2. SSYSPS  
 3. YTSAATL  
 4. VVSPFSGGGADGLT  
 5. SPFSGGGADGLT  
 35 6. DFQATT  
 7. SNEGSKA  
 8. SARDGGEG  
 9. RDGGEGSETQY  
 10. FGKGTHLIQIP  
 40 11. YIQNP  
 12. SETQY  
 13. FPGTRLLVL  
 14. EDLKN  
 15. Figura 1 secuencia de nucleótidos  
 45 16. Figura 2 (y Figura 5) secuencia de aminoácidos

17. Figura 3 secuencia de nucleótidos  
 18. Figura 4 (y Figura 6) secuencia de aminoácidos

**Ejemplo 1: receptor de células T (TCR) funcionalmente activo, específico para el péptido derivado de WT-1 pWT126 (RMFPNAPYL)**

5 Los autores de la invención han clonado un receptor de células T (TCR) que es específico para un péptido (pWT126; RMFPNAPYL) del antígeno-1 del tumor de Wilms (WT1) presentado por moléculas HLA-A2 de clase I. El factor de transcripción del WT1 se expresa en diversos tumores malignos humanos, que incluyen leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y otros. Los CTL a partir de los cuales se clonó el TCR muestran actividad de exterminio contra células de cáncer humano que expresan WT1, pero no contra células humanas normales que expresan niveles fisiológicos de WT1.

10 El objetivo terapéutico es equipar a las células T del paciente con esta potente y específica actividad de exterminio mediante la transferencia de los genes que codifican el TCR. Para ello, los autores de la invención han insertado los genes de TCR en vectores retrovirales y han demostrado que las células T humanas transducidas por genes muestran actividad de exterminio contra líneas celulares de cáncer humano y leucemia que expresan WT1. El perfil de especificidad de esta línea de CTL ha sido descrito en varios trabajos de investigación y se puede resumir como:

15 (1) Exterminio de dianas HLA-A2-positivas recubiertas con el péptido pWT126 derivado de WT1 (Gao et al (2000) Blood 95, 2198-2203); (2) Exterminio de células de leucemia HLA-A2-positivas nuevas que expresan WT1 (Gao et al (2000) Blood 95, 2198-2203); (3) Exterminio de células progenitoras de CFU leucemia HLA-A2-positivas (Gao et al (2000) Blood 95, 2198-2203; Bellantuono et al (2002) **100**, 3835-3837); (4) Exterminio de células madre LTC-IC de leucemia HLA-A2-positivas (Bellantuono et al (2002) Blood 100, 3835-3837); (5) Exterminio de células iniciadoras de leucemia NOD/SCID HLA-A2-positivas (Gao et al. (2003) Transplantation 75, 1429-1436); y (6) Ningún exterminio de células madre hematopoyéticas que injertan NOD/SCID HLA-A2-positivas (Gao et al (2003) Transplantation 75, 1429-1436). Los autores de la invención han demostrado ahora que células T humanas transducidas con el TCR específico para WT1 muestran una especificidad similar a la línea CTL a partir de la cual se clonó el TCR.

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

35 **Ejemplo 2: Selección y tratamiento de un paciente**

Células de monocitos de la sangre periférica (PBMC) se toman de un paciente HLA-A2-positivo que tiene un tumor maligno que expresa WT1. Las PBMCs se activan con anticuerpos anti-CD3/CD28 añadidos al cultivo o en perlas durante 3 días y luego se transducen con TCR que codifican partículas retrovirales, tal como se describe en el Ejemplo 1. El día 5 los autores de la invención pudieron demostrar que las células T CD4 y CD8 transducidas expresan el TCR introducido. El día 6 pudieron demostrar la actividad específica para el antígeno de las células T transducidas. El día 6, las células T transducidas se vuelven a infundir en el paciente.

**Listado de secuencias**

- <110> Imperial Innovations Limited  
 <120> Moléculas útiles desde un punto de vista terapéutico
- 45 <130> ICOBP/P32126EPdiv1
- <150> PCT/GB2004/005100  
 <151> 2004-12-06
- <150> EP 04805928.1  
 <151> 06-12-2004
- 50 <150> GB 0328363.7  
 <151> 06-12-2003
- <160> 18
- <170> SeqWin99

ES 2 689 926 T3

<210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Péptido de WT1 que es presentado por moléculas HLA-A2 de clase I  
 <400> 1  
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
 1 5  
 10 <210> 2  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CDR1? de TCR V humano?-1.5 (V?-8.2)  
 15 <400> 2  
 Ser Ser Tyr Ser Pro Ser  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CDR2? de TCR V humano?-1.5 (V?-8.2)  
 <400> 3  
 Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu  
 1 5  
 25 <210> 4  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> CDR3? de TCR V humano?-1.5 (V?-8.2) - 1  
 <400> 4  
 Val Val Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr  
 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 12  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CDR3? de TCR V humano?-1.5 (V?-8.2) - 2  
 <400> 5  
 Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr  
 40 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> CDR1? de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)  
 <400> 6

**Asp Phe Gln Ala Thr Thr**  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CDR2? de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)  
 <400> 7  
**Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala**  
 1 5  
 10 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> CDR3? de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1) - 1  
 <400> 8  
**Ser Ala Arg Asp Gly Gly Glu Gly**  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 11  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CDR3? de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1) - 2  
 <400> 9  
 25 **Arg Asp Gly Gly Glu Gly Ser Glu Thr Gln Tyr**  
 1 5 10  
 <210> 10  
 <211> 11  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos marco de la región constante C-terminal a CDR3?  
 <400> 10  
**Phe Gly Lys Gly Thr His Leu Ile Ile Gln Pro**  
 35 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Comienzo de la región constante de TCR V humano?-1.5 (V?-8.2)  
 <400> 11  
**Tyr Ile Gln Asn Pro**  
 1 5  
 45 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

ES 2 689 926 T3

<223> Comienzo de la secuencia de aminoácidos marco de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)

<400> 12  
**Ser Glu Thr Gln Tyr**  
 1 5

5 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Parte de la secuencia de aminoácidos marco de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)

10 <400> 13  
**Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Leu Val Leu**  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Parte de la región constante de TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)

<400> 14  
**Glu Asp Leu Lys Asn**  
 1 5

20 <210> 15  
 <211> 830  
 <212> ADN  
 <213> TCR V humano?-1.5 (V?-8.2)

<400> 15  
 atgctcctgc tgcctgtccc agtgctcgag gtgattttta ctctgggagg aaccagagcc 60  
 cagtcgggtga cccagcttga cagccacgtc tctgtctctg aaggaacccc ggtgctgctg 120  
 aggtgcaact actcatcttc ttattcacca tctctcttct ggtatgtgca acaccccaac 180  
 aaaggactcc agcttctcct gaagtacaca tcagcggcca ccttggttaa aggcatacaac 240  
 ggttttgagg ctgaatttaa gaagagtga acctccttcc acctgacgaa accctcagcc 300  
 catatgagcg acgcggctga gtacttctgt gttgtgagtc ctttttcagg aggaggtgct 360  
 gacggactca cctttggcaa agggactcat ctaatcatcc agccctatat ccagaaccct 420  
 gaccctgccg tgtaccagct gagagactct aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc 480  
 accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 540  
 gacaaaactg tgcctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 600  
 agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 660  
 accttcttcc ccagcccaga aagttcctgt gatgtcaagc tggctcgagaa aagctttgaa 720  
 acagatacga acctaaactt tcaaaacctg tcagtgattg ggttccgaat cctcctcctg 780  
 25 aaagtggccg ggtttaatct gctcatgacg ctgcggctgt ggtccagctg 830

<210> 16  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> TCR V humano?-1.5 (V?-8.2)

30 <400> 16

ES 2 689 926 T3

Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Leu Glu Val Ile Phe Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser His Val Ser Val  
 20 25 30  
 Ser Glu Gly Thr Pro Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Tyr  
 35 40 45  
 Ser Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Gln  
 50 55 60  
 Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ser Glu Thr Ser Phe His Leu Thr  
 85 90 95  
 Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Val Val  
 100 105 110  
 Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr Phe Gly Lys Gly  
 115 120 125  
 Thr His Leu Ile Ile Gln Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val  
 130 135 140  
 Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp  
 165 170 175  
 Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe  
 180 185 190  
 Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys  
 195 200 205  
 Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro  
 210 215 220  
 Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg  
 260 265 270  
 Leu Trp Ser Ser  
 275

- <210> 17
- 5 <211> 933
- <212> ADN
- <213> TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)
- <400> 17

ES 2 689 926 T3

```

atgctgctgc ttctgctgct tctggggcca ggctccgggc ttggtgctgt cgtctctcaa 60
catccgagct gggttatctg taagagtgga acctctgtga agatcgagtg ccgttccttg 120
gactttcagg ccacaactat gttttggtat cgtcagttcc cgaaacagag tctcatgctg 180
atggcaactt ccaatgaggg ctccaaggcc acatacgagc aaggcgtcga gaaggacaag 240
tttctcatca accatgcaag cctgaccttg tccactctga cagtgaccag tgcccatcct 300
gaagacagca gcttctacat ctgcagtgct agagatgggg gggagggttc ggagaccag 360
tacttcgggc caggcacgcg gtcctggtg ctcgaggacc tgaaaaacgt gttcccacc 420
gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 480
gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccagc cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg 540
aaggaggtgc acagtgggtt cagcacagac ccgacgccc tcaaggagca gccgcctc 600
aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac 660
ccccgaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg 720
accagagata gggccaaacc tgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg ggtagagca 780
gactgtggct tcacctccga gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat 840
gagatcttgc tagggaagc caccttgat gccgtgctgg tcagtgccct cgtgctgatg 900
gccatggtca agagaaggga ttccagaggg tag 933

```

<210> 18

<211> 310

<212> PRT

5 <213> TCR V humano?-2.1 (V?-20.1)

<400> 18

```

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala
 1          5          10          15

Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser
 20          25          30

Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe
 35          40          45

Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser
 50          55          60

Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys
 65          70          75          80

Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr

```

ES 2 689 926 T3

85					90					95					
Ser	Ala	His	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ala	Arg	Asp
			100					105					110		
Gly	Gly	Glu	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu
		115					120					125			
Leu	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val
	130					135					140				
Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu
145					150					155					160
Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp
				165					170					175	
Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln
		180						185					190		
Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His
	210					215					220				
Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp
225					230					235					240
Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala
				245					250					255	
Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly
			260					265					270		
Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
	290					295					300				
Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly										
305					310										

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de receptor celular T (TCR) que contiene una porción de cadena alfa y una porción de cadena beta, en donde la porción de cadena alfa comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\alpha$ : SSYSPPS

5 CDR2 $\alpha$ : Y TSAATL

CDR3 $\alpha$ : VVSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT

y la porción de cadena beta comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\beta$ : DFQATT

CDR2 $\beta$ : SNEGSKA

10 CDR3 $\beta$ : que comprende SARDGGEG o RDGGEGSETQY,

molécula de TCR que es capaz de unirse a un complejo de HLA-A2/RM-FPNAPYL.

2. Una molécula de TCR de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas, o en donde la porción de cadena alfa y la porción de cadena beta están presentes en la misma cadena polipeptídica.

15 3. Una molécula de TCR de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde las CDRs se injertan en una región de marco humana.

4. Un TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una treonina en la región constante de la cadena alfa y una serina en la región constante de la cadena beta son reemplazadas por una cisteína introduciendo un enlace disulfuro entre los residuos.

20 5. Una molécula de TCR de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la porción de cadena alfa tiene la secuencia de aminoácidos dada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 16) y/o en donde la porción de cadena beta tiene la secuencia de aminoácidos dada en la Figura 4 (SEQ ID NO: 18).

25 6. Una molécula de TCR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha molécula de TCR contiene una cadena alfa que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica mostrada en la Figura 2 o la Figura 5 y contiene una cadena beta que contiene la región V y la región C de la cadena polipeptídica mostrada en la Figura 4 o la Figura 6, o una variante de la misma, en donde una treonina en la región constante de la cadena alfa y una serina en la región constante de la cadena beta son reemplazadas por una cisteína, introduciendo un enlace disulfuro entre los residuos.

7. Una molécula de TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es soluble.

30 8. Un kit de partes o composición que comprende un polinucleótido que codifica la porción de cadena alfa según se define en la reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica la porción de cadena beta según se define en la reivindicación 1.

35 9. Un polinucleótido que codifica la porción de cadena alfa según se define en la reivindicación 1 y la porción de cadena beta según se define en la reivindicación 1 o que codifica la molécula de TCR de cadena sencilla según se define en la reivindicación 2.

10. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, o que comprende un polinucleótido que codifica la porción de cadena alfa según se define en la reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica la porción de cadena beta según se define en la reivindicación 1.

40 11. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el vector de expresión es capaz de expresar un polipéptido en una célula de mamífero, opcionalmente en donde la célula de mamífero es una célula T tal como un CTL humano.

12. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el vector de expresión es un vector retroviral tal como un vector lentiviral.

45 13. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, o una molécula de TCR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente en donde la célula huésped es (i) una célula de mamífero tal como una célula humana.

14. Una célula huésped que expresa una molécula de TCR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1

a 8.

15. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde dicha célula es una célula T derivada de un paciente.

5 16. Una célula T, preferiblemente una célula T derivada de un paciente, modificada para expresar la molécula de TCR de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en combatir un tumor maligno que expresa WT1 en el paciente, en donde el tumor maligno que expresa WT1 es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma o sarcoma; opcionalmente, en donde un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8 o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 ha sido introducido en la célula T, preferiblemente célula T derivada del  
10 paciente, de modo que la célula T expresa la molécula de TCR codificada.

17. Un método de seleccionar una molécula de TCR con unión mejorada a un complejo de HLA-A2/RMFPNAPYL, comprendiendo dicho método

15 (a) proporcionar una molécula de TCR que comprende una porción de cadena alfa y una porción de cadena beta, en donde la porción de cadena alfa comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\alpha$ : SSYSPS

CDR2 $\alpha$ : Y TSAATL

CDR3 $\alpha$ : VVSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT

y la porción de cadena beta comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

20 CDR1 $\beta$ : DFQATT

CDR2 $\beta$ : SNEGSKA

CDR3 $\beta$ : que comprende SARDGGEG o RDGGEGSETQY,

25 en donde al menos un residuo aminoácido en una o más de las CDR dadas se reemplaza por otro residuo aminoácido, (b) determinar si la molécula de TCR se une a un complejo de HLA-A2/RMFPNAPYL con mayor afinidad que una molécula de TCR sin el o los aminoácidos de sustitución, y (c) seleccionar una molécula que se une con mayor afinidad; opcionalmente, en donde las CDRs son como se definen en la reivindicación 1.

18. Una molécula de receptor de células T (TCR) que contiene una porción de cadena alfa y una porción de cadena beta, en donde la porción de cadena alfa comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\alpha$ : SSYSPS

30 CDR2 $\alpha$ : Y TSAATL

CDR3 $\alpha$ : VVSPFSGGGADGLT o SPFSGGGADGLT

y la porción de cadena beta comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 $\beta$ : DFQATT

CDR2 $\beta$ : SNEGSKA

35 CDR3 $\beta$ : que comprende SARDGGEG o RDGGEGSETQY, y

molécula de TCR que es capaz de unirse a un complejo de HLA-A2/RM-FPNAPYL, para uso en tratamiento.

19. Una molécula de TCR de acuerdo con la reivindicación 18, para uso en el tratamiento del cáncer.

40 20. Una molécula de TCR para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer es uno o más cánceres seleccionados de leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma y sarcoma.

Figura 1:

**Secuencia codificante del TCR Va-1.5 (Va-8.2) humano**

ATGCTCCTGC TGCTCGTCCC AGTGCTCGAG GTGATTTTAA CTCTGGGAGG  
 AACAGAGCC CAGTCGGTGA CCGAGCTTGA CAGCCACGTC TCTGTCTCTG  
 AAGGAACCC GGTGCTGCTG AGGTGCAACT ACTCATCTTC TTATTCACCA  
 TCTCTTCT GGTATGTGCA ACACCCCAAC AAAGGACTCC AGCTTCTCCT  
 GAAGTACACA TCAGCGGCCA CCCTGGTTAA AGGCATCAAC GGTTTTGAGG  
 CTGAATTTAA GAAAGAGTAA ACCTCCTTCC ACCTGACGAA ACCCTCAGCC  
 CATATGAGCG ACGCGGCTGA GTACTTCTGT GTTGAGTGC CTTTTTCAGG  
 AGGAGGTGCT GACGGACTCA CTTTGGCAA AGGGACTCAT CTAATCATCC  
 AGCCCTAT CCAGAACCCT GACCCTGCCG TGTACCAGCT GAGAGACTCT  
 AAATCCAGTG ACAAGTCTGT CTGCCATTTC ACCGATTTTG ATTCTCAAAC  
 AAATGTGTCA CAAAGTAAGG ATTCTGATGT GTATATCACA GACAAAACGTG  
 TGCTAGACAT GAGGTCTATG GACTTCAAGA GCACACAGTGC TGTGGCCTGG  
 AGCAACAAT CTGACTTTGC ATGTGCAAAC GCCTTCAACA ACAGCATTAT  
 TCCAGAAGAC ACCTTCTTCC CCAGCCCAGA AAGTTCCTGT GATGTCAAGC  
 TGGTCGAGAA AAGCTTTGAA ACAGATACGA ACCTAAACTT TCAAAACCTG  
 TCAGTGATTG GGTTCGGAAT CCTCCTCCTG AAAGTGCCCG GGTTTAATCT  
 GCTCATGACC CTGCGGGCTGT GGTCCAGCTG A

Figura 2:

**Secuencia de la proteína del TCR Va-1.5 (Va-8.2) humano**

MLLLLVPVLEVI<sup>FR1</sup>FTLGGTRAQSVTQLDSDSHVSVSEGT  
<sup>CDR1</sup>  
PVLLRCNYSSYS<sup>FR2</sup>PSLFWYVQHPNKGLQLLLKYT  
<sup>CDR2</sup>  
SAATLVKINGF<sup>FR3</sup>EAEFFKSETSFHLTKPSAHMSDA  
<sup>CDR3</sup>  
AEYFCVVSPFSGGGADGLT  
 constante  
 FGKGT<sup>H</sup>LIQPYIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF  
 TDFDSQTNVS QSKDSDVYIT DKT<sup>V</sup>LDMRSM  
 DFKNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPED  
 TFFPSESSCDVKLVEKSFETD<sup>N</sup>LNLFQNL<sup>S</sup>VI<sup>G</sup>FRIL  
 LLKVAGFNLLMT LRLWSS

Figura 3:

**Secuencia codificante del TCR V $\beta$ -2.1 (V $\beta$ -20.1) humano**

ATGCTGCTGC TTCTGCTGCT TCTGGGGCCA GGTCCGGGC TTGGTCTGT  
 CGTCTCTCAA CATCCGAGCT GGGTTATCTG TAAGAGTGA ACCTCTGTGA  
 AGATCGAGTG CCGTTCCCTG GACTTTCAGG CCACAACATAT GTTTTGAT  
 CGTCAGTTCC CGAAACAGAG TCTCATGCTG ATGGCAACTT CCAATGAGGG  
 CTCCAAAGGCC ACATACGAGC AAGGCGTCA GAAGACAAG TTTTCATCA  
 ACCATGCAAG CCTGACCTTG TCCACTCTGA CAGTGACCAG TGCCCATCCT  
 GAAGACAGCA GCTTCTACAT CTGCAGTCT AGAGATGGG GGGAGGGTTT  
 GGAGACCCAG TACTTCGGGC CAGGCACGGC GCTCCTGGTG CTCGAGGACC  
 TGA AAAACGT GTTCCCACCC GAGGTGCTG TGTGAGCC ATCAGAAGCA  
 GAGATCTCC ACACCCAAA GGGCACACTG GTGTGCTGG CCACAGGCTT  
 CTACCCCGAC CACGTGGAGC TGAGCTGGT GGTGAATGGG AAGGAGGTG  
 ACAGTGGGT CAGCACAGAC CCGAGCCCC TCAAGGAGCA GCCCGCCCTC  
 AATGACTCCA GATACTGCCT GAGCAGCCG CTGAGGGTCT CGGCCACCTT  
 CTGGCAGAAC CCCCAGAAC ACTTCCGCTG TCAAGTCCAG TTCTACGGGC  
 TCTCGGAGAA TGACGAGTGG ACCCAGGATA GGGCCAAAACC TGTCACCCAG  
 ATCGTCAGCG CCGAGGCCTG GGGTAGAGCA GACTGTGGCT TCACCTCCGA  
 GTCTTACCAG CAAGGGTCC TGTCTGCCAC CATCCTCTAT GAGATCTTGC  
 TAGGGAAAGGC CACCTTGTAT GCCGTGCTGG TCAGTGCCCT CGTGCTGATG  
 GCCATGGTCA AGAGAAAGGA TTCCAGAGGC TAG

Figura 4:  
**Secuencia de la proteína del TCR V $\beta$ -2.1 (V $\beta$ -20.1) del TCR humano**

MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPSPWVICKSGT**SVKIECR**<sup>FR1</sup>  
 CDR1 <sup>FR2</sup> CDR2  
 SLDFQATTFMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKAT**YEQ**  
 CDR3 <sup>FR3</sup>  
 GVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC**SARD**  
 CDR3  
GGEG  
 constante  
 SETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ  
 KATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL  
 KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQPNRHFRCQVQFY  
 GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCCGFTSESYQ  
 QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVKKR**KDS**  
 RG

Figura 5:

**Secuencia de la proteína del TCR Va-1.5 (Va-8.2) humano**

MLLLLVPVLEVFTLGGTRAQSVTQLDSSHVSVSEGT <sup>FR1</sup>  
 PVLRLRCNYSSSYSPSLFWYVQHHPNKGLQLLLK<sup>CDR1</sup>YI <sup>FR2</sup>  
 SAATLVKINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDA <sup>FR3</sup>  
 AEYFCVVSPFSGGGADGLTFGKGT<sup>CDR2</sup>HLI<sup>CDR3</sup>QIP <sup>Ja5</sup>  
 constante  
 YIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVS  
 QSKDSDVYETDKTVLDMRSM  
 DFKNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPED  
 TFFSPESSCDVKLVEKSFETDNLNFQNL<sup>CDR3</sup>SVIGFRIL  
 LLKVAGFNLLMTLRLWSS

Figura 6:

**Secuencia de la proteína V $\beta$ -2.1 (V $\beta$ -20.1) del TCR humano**

MLLLLLLGPGGLGAVV<sup>FR1</sup>SQHPSWVICKSGT<sup>FR1</sup>SVKIECR  
<sup>CDR1</sup>SLDFQATT<sup>FR2</sup>MFWRQFPKQSL<sup>CDR2</sup>MLMATSNEGSKATYEQ  
<sup>FR3</sup>GVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARD  
<sup>CDR3</sup>GGEGSETQYFGPTRLLVL<sup>V<sub>2.5</sub></sup>  
 Constante 2  
 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH  
 VELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS  
 RLRVSA<sup>FR3</sup>TFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP  
 VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYELLGK  
 ATLYAVLVSALVLMAMVKKKDSRG

Figura 7:

### Construcciones retrovirales del TCR

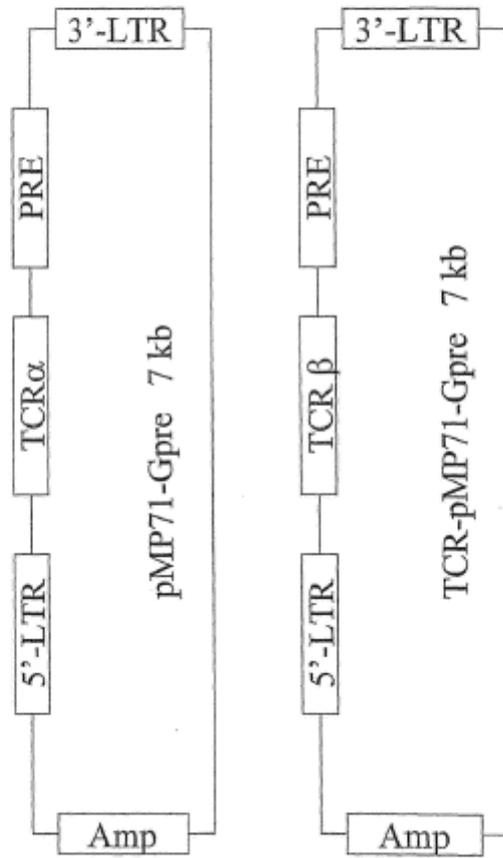


Figura 8:  
**Expresión de TCR en PBMC humana tras transducción**

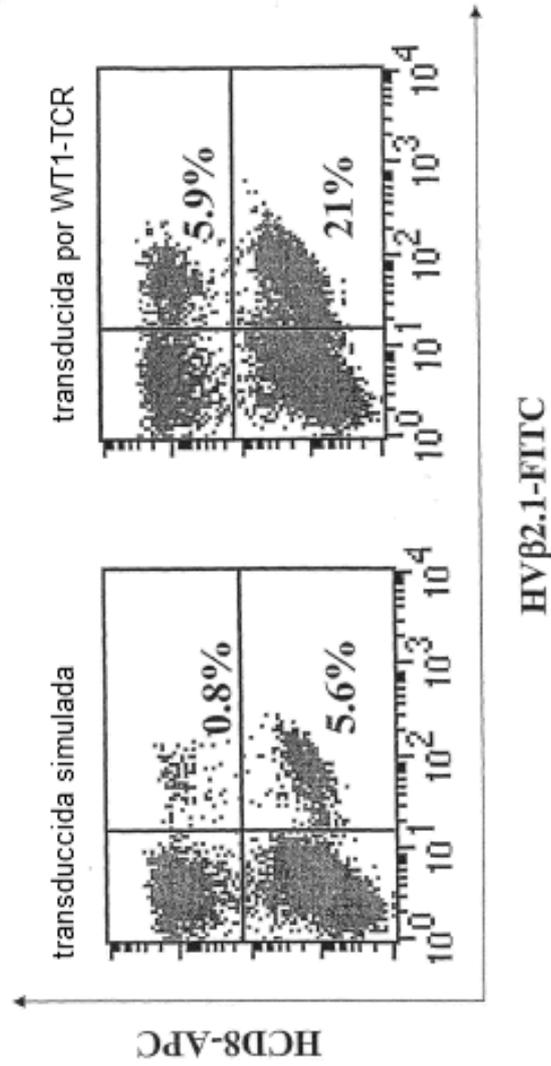


Figura 9:

**Incremento de Células T CD8<sup>+</sup>-Vb2.1<sup>+</sup>  
tras estimulación del antígeno**

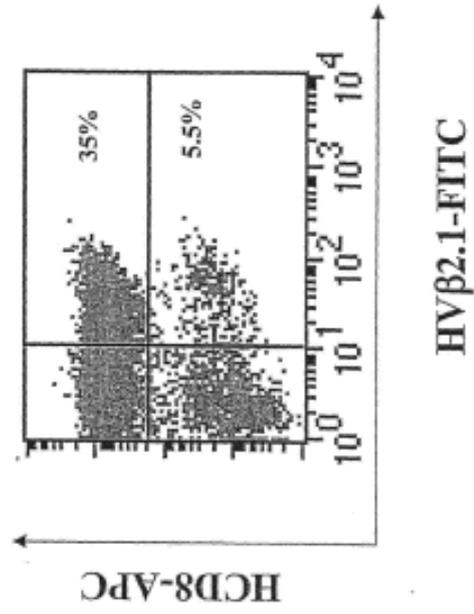


Figura 10:

TCR específico para PBMC transducida con pWT126

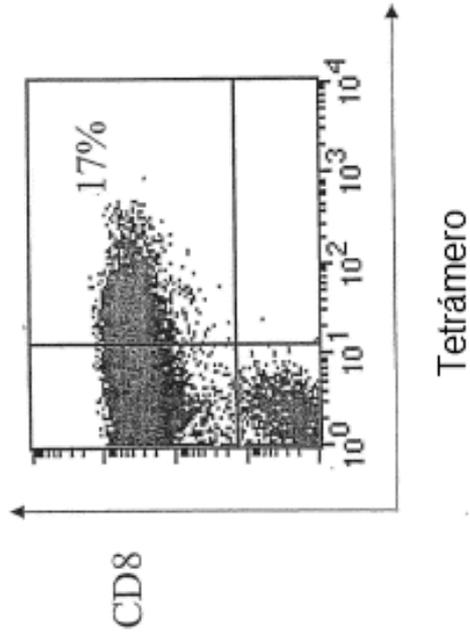


Figura 11:

Células T a granel transducidas por TCR muestran actividad de exterminio específica para pWT126

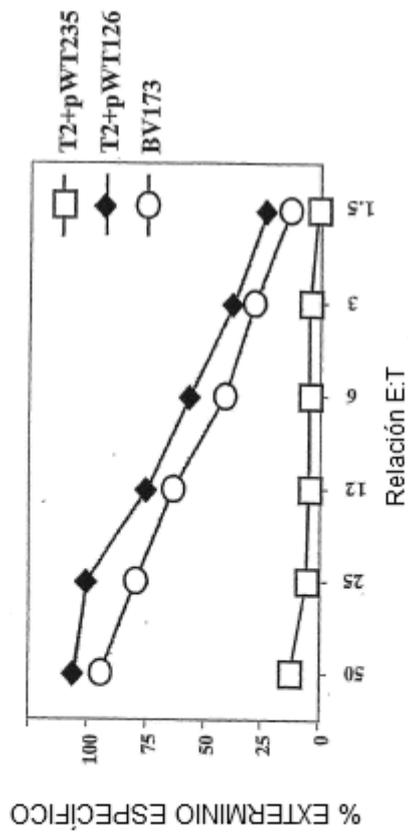


Figura 12:

**Células CD8+ transducidas por TCR muestran actividad de exterminio específica para WT126**

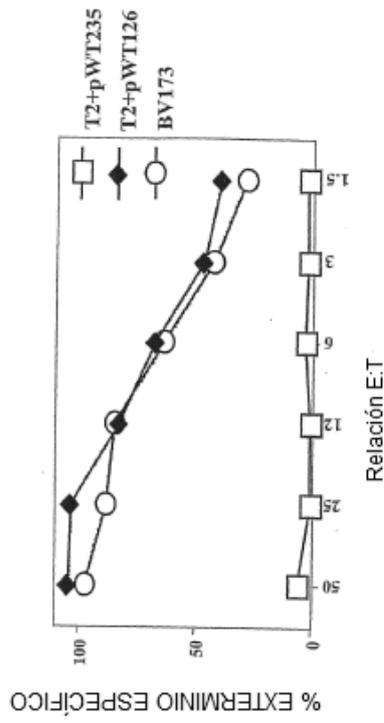


Figura 13:

TCR específico para CD4 clasificada como PBMC transducida por pWT126

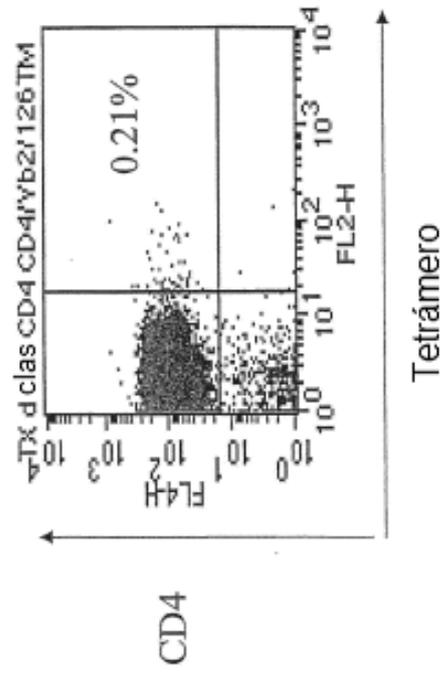


Figura 14:

Células T CD4+ transducidas por TCR muestran actividad de exterminio específica para pWT126

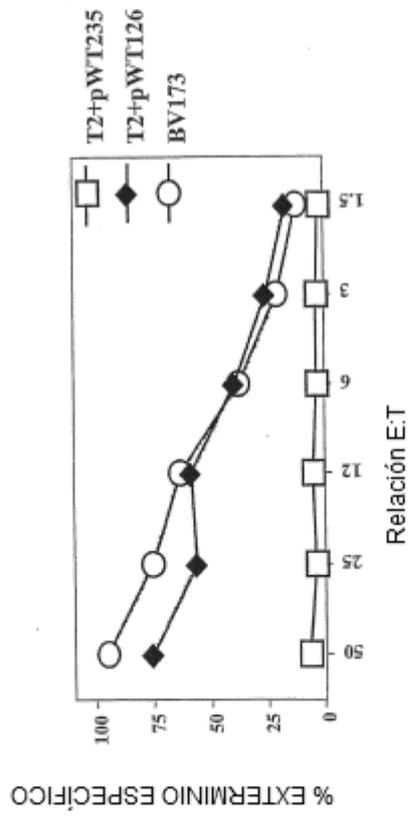
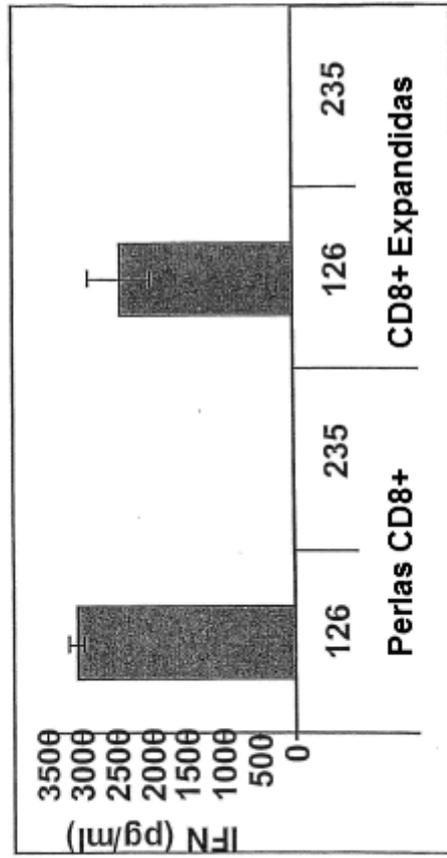


Figura 15:  
Células T CD8+ transducidas por TCR muestran producción de IFN- $\gamma$  específica para pWT126



Tras 20 h de incubación

Figura 16:

