

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 058**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 16176246 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3112376**

54 Título: **Polipéptidos bifuncionales**

30 Prioridad:

**20.05.2009 GB 0908613**

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

**26.07.2019**

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LTD. (100.0%)  
101 Park Drive, Milton Park  
Abingdon OX14 4RY, Oxfordshire , GB**

72 Inventor/es:

**JAKOBSEN, BENT KARSTEN;  
VUIDEPOT, ANNE LISE BRIGITTE y  
LI, YI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 721 058 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

## Polipéptidos bifuncionales

5 La presente invención se refiere a un polipéptido bifuncional que comprende un compañero de unión específico para un epítipo de péptido-MHC, y un efector inmunológico, tal como un anticuerpo o una citoquina, estando la parte del efector inmunológico unida al extremo N-terminal de la parte de unión al péptido-MHC y siendo el compañero de unión específico un anticuerpo.

10 Antecedentes de la invención

Los receptores de linfocitos T (del inglés, *T cell receptors*) actúan como mediadores en el reconocimiento de complejos de Complejo de Histocompatibilidad Principal (MHC) Específico - péptido ("complejos de pMHC") que se presentan como epítopos en células de presentación de antígenos (APC), y los TCR actúan como mediadores en el reconocimiento de tales epítopos de pMHC por linfocitos T. Como tales, los TCR son esenciales para el funcionamiento de la rama celular del sistema inmunológico.

También se conocen anticuerpos que se unen de forma específica a epítopos de pMHC presentados por células de presentación de antígenos (véase, por ejemplo: Neethling FA. *et al.*, Vaccine (2008) 26 (25): 3092-102). Existen anticuerpos de fragmento de unión antígeno (Fab) (véase, por ejemplo: Chames P. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A (2000) 97 (14): 7969-74; Willemsen RA. *et al.*, J Immunol (2005) 174 (12): 7853-8; Willemsen R. *et al.*, Cytometry A (2008) 73 (11): 1093-9) o fragmentos de anticuerpo de una sola cadena (scFv) (véase por ejemplo: Denkberg G. *et al.*, J Immunol (2003) 171 (5): 2197-207; Marget M. *et al.*, Mol Immunol (2005) 42 (5): 643-9) que se unen de forma específica a epítopos de pMHC.

25 El TCR nativo es una proteína de superficie celular heterodimérica de la superfamilia de inmunoglobulina que está asociada con proteínas invariantes del complejo CD3 implicado en la mediación de la transducción de señales. Los TCR existen en las formas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , que son estructuralmente similares, pero que tienen ubicaciones anatómicas y probablemente funciones muy distintas. Los ligandos de clase I y clase II de MHC también son proteínas de superfamilia de inmunoglobulina, pero están especializados para presentación de antígenos, con un sitio de unión de péptido altamente polimórfico que les permite presentar una diversidad de fragmentos peptídicos cortos en la superficie celular APC.

35 La porción extracelular de los TCR  $\alpha\beta$  heterodiméricos nativos consiste en dos polipéptidos (las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ), cada uno de los cuales tiene un dominio constante proximal a la membrana y un dominio variable distal de la membrana. Cada uno de los dominios constante y variable incluye un puente disulfuro intracadena. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. CDR3 de los TCR  $\alpha\beta$  interactúan con el péptido presentado por MHC, y las CDR 1 y 2 de los TCR  $\alpha\beta$  interactúan con el péptido y el MHC. La diversidad de las secuencias de TCR se genera a través de la reorganización somática de la variable ligada (V), diversidad (D), unión (J), y genes constantes (C).

Los polipéptidos de cadena  $\alpha$  funcionales están formados por regiones V-J-C reordenadas, mientras que las cadenas  $\beta$  consisten en regiones V-D-J-C. El dominio constante extracelular tiene una región proximal de membrana y una región de inmunoglobulina. Hay un solo dominio de cadena constante, conocido como TRAC. El dominio constante de la cadena  $\beta$  está formado por uno de los dos dominios constantes  $\beta$  diferentes, conocidos como TRBC1 y TRBC2 (nomenclatura IMGT). Hay cuatro cambios de aminoácidos entre estos dominios  $\beta$  constantes. Todos estos cambios están dentro del exón 1 de TRBC1 y TRBC2: N<sub>4</sub>K<sub>5</sub>->K<sub>4</sub>N<sub>5</sub> y F<sub>37</sub>->Y (numeración IMGT, diferencias de TRBC1->TRBC2 siendo el cambio final de aminoácidos entre las dos regiones constantes de cadena  $\beta$  de TCR en el exón 3 de TRBC1 y TRBC2: V<sub>1</sub>->E.

50 Hasta la fecha se han ideado un número de construcciones para la producción de los TCR recombinantes. Estas construcciones se dividen en dos clases amplias, los TCR de cadena sencilla y los TCR diméricos. Los TCR de cadena sencilla (scTCR) son construcciones artificiales que consisten en una sola cadena de aminoácidos, que al igual que los TCR heterodiméricos nativos se unen a complejos de MHC-péptido. Los scTCR pueden consistir en una combinación de regiones variables de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  (V $\alpha$  y V $\beta$  respectivamente) y regiones constantes de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  (C $\alpha$  y C $\beta$  respectivamente), unidas por una secuencia conectora (L) en varias orientaciones posibles, por ejemplo, pero que no se limitan a, las siguientes V $\alpha$ -L-V $\beta$ , V $\beta$ -L-V $\alpha$ , V $\alpha$ -C $\alpha$ -L-V $\beta$  o V $\beta$ -C $\beta$ -L-V $\alpha$ .

60 Un número de artículos describe la producción de heterodímeros de TCR que incluyen el puente disulfuro nativo que conecta las subunidades respectivas. Sin embargo, aunque tales TCR pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos de TCR, no se ha demostrado que ninguno de ellos reconozca su ligando nativo en nada que no sea concentraciones relativamente elevadas y/o no sean estables.

65 En el documento WO 03/020763 se describe un TCR soluble que está plegado correctamente de manera que es capaz de reconocer su ligando nativo, es estable durante un periodo de tiempo y se puede producir en cantidades razonables. Este TCR comprende un dominio extracelular de cadena  $\alpha$  de TCR dimerizado con respecto a un

dominio extracelular de cadena  $\beta$  de TCR respectivamente, por medio de un puente disulfuro intercadena entre cisteínas introducidas en las regiones constantes de las respectivas cadenas.

Los compañeros de unión a pMHC específicos, es decir, anticuerpos específicos para epítomos de pMHC, y los TCR de ambos tipos tanto heterodimérico como de una sola cadena, se han propuesto como vectores diana para la administración de agentes terapéuticos para células de presentación de antígeno. Para ese fin, se requiere que el agente terapéutico se asocie de algún modo con el compañero de unión a pMHC. Los agentes terapéuticos que se han sugerido para dicha administración dirigida en asociación con los compañeros de unión a pMHC incluyen anticuerpos (véase, por ejemplo: Mosquera LA. *et al.*, J Immunol (2005) 174 (7): 4381-8), citoquinas (véase por ejemplo: Belmont HJ. *et al.*, Clin Immunol (2006) 121 (1): 29-39; Wen J. *et al.*, Cancer Immunol Immunother (2008) 57 (12): 1781-94), y agentes citotóxicos. Cuando el agente terapéutico es un polipéptido, los medios de asociación con el compañero de unión a pMHC pueden ser por fusión peptídica, ya sea fusión directa o fusión a través de una secuencia conectora, al compañero de unión a pMHC. En estos casos, hay esencialmente solamente dos posibilidades de fusión. En el caso de anticuerpos de una sola cadena o los TCR, la fusión puede estar en principio en el extremo C- o N-terminal de la cadena de TCR; en el caso de anticuerpos heterodiméricos o los TCR, la fusión puede estar en principio en el extremo C- o N-terminal de cualquier cadena. Sin embargo, en la práctica, parece que todos los ejemplos conocidos de fusiones de agentes de unión a pMHC-agente terapéutico han sido con el agente terapéutico fusionado en el extremo C-terminal (véase por ejemplo: Mosquera LA. *et al.*, J Immunol (2005) 174 (7): 4381-8; Belmont HJ. *et al.*, Clin Immunol (2006) 121 (1): 29-39; Wen J. *et al.*, Cancer Immunol Immunother (2008) 57 (12): 1781-94). Esto se produce por funcionalidad de un anticuerpo o TCR, ya sea heterodimérico o de una sola cadena, depende del plegamiento y la orientación correctos de las regiones variables. La fusión del agente terapéutico en el extremo N-terminal del compañero de unión a pMHC le coloca más allá de una de las regiones variables, y se ha producido una suposición en la técnica de que el agente terapéutico situado en el extremo N-terminal interferirá con la unión del anticuerpo o TCR con el complejo de pMHC, reduciendo de ese modo su eficacia de unión.

La presente invención proporciona una molécula bifuncional que comprende un compañero de unión a polipéptido específico para un epítomo de pMHC dado, y un polipéptido efector estando el extremo N-terminal del compañero de unión a pMHC unido al extremo C-terminal del polipéptido efector inmunológico, en el que compañero de unión a polipéptido es un anticuerpo.

Al contrario de la suposición en la técnica, ahora se ha encontrado que las moléculas bifuncionales en las que una parte del efector inmunológico está fusionada con el extremo N-terminal de un compañero de unión a pMHC son más eficaces en su introducción de la respuesta inmunológica relevante que la de la construcción correspondiente en la que la fusión se produce en el extremo C-terminal del compañero de unión a pMHC. Este aumento de la respuesta inmunológica de la construcción fusionada en N se consigue a pesar de las afinidades de unión a pMHC similares de las versiones N- y C-fusionadas.

La unión del compañero de unión a pMHC y el polipéptido efector inmunológico puede ser directa, o indirecta a través de una secuencia conectora. Las secuencias conectoras normalmente son simples, porque están formadas por aminoácidos tales como glicina, alanina y serina que no tienen cadenas laterales voluminosas que probablemente limitan la flexibilidad. Las longitudes utilizables u óptimas de secuencias conectoras se determinan fácilmente en el caso de cualquier construcción dada de compañero de unión a pMHC-efector inmunológico. A menudo la secuencia conectora tendrá una longitud de menos de aproximadamente 12, tal como menos de 10, o de 5-10 aminoácidos.

En algunas realizaciones de la invención, el compañero de unión a pMHC es un par de polipéptidos TCR  $\alpha\beta$  heterodiméricos en el que cada uno de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  tienen regiones TCR variables y constantes, pero carecen de regiones TCR transmembrana y citoplasmática. En tales casos, la parte de TCR es soluble. En moléculas bifuncionales particularmente precedentes de este tipo, está presente un puente disulfuro no nativo entre restos de las regiones constantes de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR. En particular, las regiones constantes de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden estar unidas mediante un puente disulfuro entre restos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC1 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1 o TRBC2, o por el puente disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC\*01 y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

En otras realizaciones de la invención, el compañero de unión a pMHC es un polipéptido TCR  $\alpha\beta$  de una sola cadena del tipo  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$  o  $V\beta$ - $C\beta$ -L- $V\alpha$  en el que  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR respectivamente,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR respectivamente, y L es una secuencia conectora.

Se conocen polipéptidos efectores inmunológicos. Son moléculas que inducen o estimulan una respuesta inmunológica, a través de activación directa o indirecta de la rama humoral o celular del sistema inmunológico, tal como mediante activación de los linfocitos T. Los ejemplos incluyen IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , anticuerpo Anti-CD2, anticuerpo Anti-CD3, anticuerpo Anti-CD4, anticuerpo Anti-CD8, anticuerpo Anti-CD44, anticuerpo Anti-CD45RA, anticuerpo Anti-CD45RB, anticuerpo Anti-CD45RO, anticuerpo Anti-CD49a, anticuerpo Anti-CD49b, anticuerpo Anti-CD49c, anticuerpo Anti-CD49d,

anticuerpo Anti-CD49e, anticuerpo Anti-CD49f, anticuerpo Anti-CD16, anticuerpo Anti-CD28, anticuerpos Anti-IL-2R, proteínas y péptidos de virus y proteínas y péptidos de bacterias. Cuando el polipéptido efector inmunológico es un anticuerpo, este puede unirse específicamente a un linfocito T y puede ser un anticuerpo scFv. El polipéptido efector inmunológico puede ser un anticuerpo anti-CD3, tal como un anticuerpo scFv anti-CD3. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD3 incluyen, pero no se limitan a, OKT3, UCHT-1, BMA031 y 12F6. El polipéptido efector inmunológico puede ser una citoquina que module la actividad inmunosupresora o inmunoestimuladora de los linfocitos.

En el presente documento se desvelan moléculas bifuncionales en las que el compañero de unión al polipéptido de pMHC es un TCR. El TCR puede ser un par de polipéptidos de  $\alpha\beta$  TCR heterodiméricos, o un polipéptido de  $\alpha\beta$  TCR de una sola cadena, y el extremo N de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  del par de polipéptidos de TCR heterodiméricos, o el extremo N del polipéptido de scTCR, puede estar unido a un aminoácido C-terminal del polipéptido efector inmunológico. En el presente documento se desvelan moléculas bifuncionales en las que el compañero de unión a pMHC es un par de polipéptidos de  $\alpha\beta$  TCR heterodiméricos en el que cada uno de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  tiene regiones variables y constantes de TCR, pero carece de regiones transmembrana y citoplasmáticas de TCR. En dichos casos, la parte TCR es soluble. En moléculas bifuncionales particularmente preferidas de este tipo, hay un enlace disulfuro no nativo entre los restos de las regiones constantes de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR. En particular, las regiones constantes de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden estar unidas por un enlace disulfuro entre los restos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC1 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1 o TRBC2, o por el enlace disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC\*01 y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2. En el presente documento se desvelan moléculas bifuncionales en las que el compañero de unión a pMHC es un polipéptido de  $\alpha\beta$  TCR de una sola cadena del tipo  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ -C $\alpha$ -L- $V\beta$  o  $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C $\beta$  en el que  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR, respectivamente, C $\alpha$  y C $\beta$   $\alpha$  son regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y L es una secuencia conectora.

Los principios de la invención se ilustran en los siguientes Ejemplos de referencia.

Ejemplo de referencia A. Preparación de TCR  $\alpha\beta$  solubles que tienen polipéptidos efectores fusionados al extremo C- o N-terminal de la cadena  $\beta$  de TCR

A1. TCR de NY-ESO soluble con Anticuerpo Anti-CD3 como Polipéptido Efector

El TCR de NY-ESO soluble de este ejemplo tiene la propiedad de unirse al péptido SLLMWITQV cuando está presente en una molécula de HLA-A2.

La SEQ ID No: 1 (Figura 1) es la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de un TCR de NY-ESO, en el que C162 (usando la numeración de SEQ ID No: 1) sustituye a T48 de su región constante TRAC.

La SEQ ID No: 2 (Figura 2) es la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de TCR de NY-ESO, en la que C170 (usando la numeración de SEQ ID No: 2) sustituye a S57 de su región constante TRBC2.

La SEQ ID No: 3 (Figura 3) es la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de scFv anti CD3 UCHT-1, que es la secuencia intra conectora subrayada.

La Figura 4 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR de  $\alpha\beta$  de NY-ESO soluble que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 2, y que tiene el anticuerpo de scFv anti CD3 UCHT-1 de SEQ ID No: 3 fusionado en el extremo N-terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 2 a través de una secuencia conectora L1, en particular GGEGS (SEQ ID No: 4).

La SEQ ID No: 14 (Figura 16) es la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la figura 2 con el extremo N-terminal de un anticuerpo scFv anti-CD3 fusionado con el extremo C-terminal de la cadena beta de TCR a través de otra secuencia conectora peptídica (subrayada).

La SEQ ID No: 15 (Figura 17) es la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la figura 2 con el extremo C-terminal de un anticuerpo scFv anti-CD3 fusionado con el extremo N-terminal de la cadena beta de TCR a través de la misma secuencia conectora peptídica que en la SEQ ID No: 14 (de nuevo subrayada).

La construcción de la Figura 4 se preparó de la siguiente manera:

#### Ligamiento

Los genes sintéticos que codifican (a) la cadena  $\alpha$  de TCR de SEQ ID No: 1 y (b) la secuencia de fusión de SEQ ID No: 2 y SEQ ID No: 3, se ligaron por separado en plásmidos de expresión basados en pGMT7, que contienen el promotor T7 para expresión de nivel elevado en la cepa BL21-DE3(pLysS) de *E. coli* (Pan *et al.*, Biotechniques (2000) 29 (6): 1234-8).

*Expresión*

Los plásmidos de expresión se transformaron por separado en la cepa BL21 (DE3) Rosetta pLysS de *E. coli*, y las colonias resistentes a ampicilina individuales se cultivaron a 37 °C en medio TYP (10 µg/ml de ampicilina) con una DO<sub>600</sub> de ~0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteína con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción por centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en una centrifugadora J-6B de Beckman. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (NovaGen) en presencia de MgCl<sub>2</sub> y DNasa. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrifugadora J2-21 de Beckman. A continuación, se realizaron tres lavados con detergente para retirar los residuos celulares y los componentes de la membrana. Cada vez, el sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizaba en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, Triton-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM,) antes de sedimentar mediante centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en una centrifugadora J2-21 de Beckman. A continuación, se retiró el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Por último, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C.

*Replegamiento*

Aproximadamente 20 mg de cadena α de TCR y 40 mg cuerpos de inclusión solubilizados de cadena β de scFv-TCR se descongelaron a partir de soluciones de reserva congeladas, diluidos en 20 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 20 mM), y se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 min-1 hr para asegurar la desnaturalización completa de la cadena. A continuación, la solución de guanidina que contenía cadenas de TCR totalmente reducidas y desnaturalizadas se inyectó en 1 litro del siguiente tampón de replegamiento: Tris 100 mM a pH 8,1, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. El par redox (clorhidrato de cistamina y diclorhidrato de cistamina (a concentraciones finales de 16 mM y 1,8 mM, respectivamente)) se añadieron aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas α de TCR y β de scFv-TCR desnaturalizadas. La solución se dejó durante ~30 minutos. El scFv-TCR replegado se dializó en membranas de celulosa con tubo de diálisis (Sigma-Aldrich; Producto N.º D9402) frente a 10 l de H<sub>2</sub>O durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces a Tris 10 mM recién preparado a pH 8,1 (10 l) y la diálisis continuó a 5 °C ± 3 °C durante otras ~8 horas. El scFv-TCR soluble y correctamente plegado se separó de los productos de degradación legados de forma errónea e impurezas con un método de purificación de 3 etapas como se describe a continuación. La segunda etapa de purificación puede ser cualquiera de una cromatografía de intercambio iónico o una cromatografía por afinidad, dependiendo del pI de la fusión anti-CD3 scFv-TCR soluble.

*Primera etapa de purificación*

El replegamiento dializado (en Tris 10 mM a pH 8,1) se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM sobre 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones del pico (que eluyen a una conductividad ~20 mS/cm) se almacenaron a 4 °C. Las fracciones del pico se analizaron con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación.

*Segunda etapa de purificación**Cromatografía de intercambio iónico*

## Purificación por intercambio catiónico

El tampón de las fracciones combinadas por intercambio aniónico se intercambió mediante dilución con MES 20 mM a pH 6-6,5, dependiendo del pI de la fusión de scFv-TCR. El scFv-TCR soluble y correctamente plegado se separó de los productos de degradación plegados de manera errónea cargando las fracciones combinadas diluidas (en MES 20 mM a pH 6-6,5) en una columna de intercambio catiónico POROS 50HS y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM sobre 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones del pico (que eluyen a una conductividad ~10 mS/cm) se almacenaron a 4 °C.

Como alternativa, la purificación de intercambio iónico usando matriz de hidroxiapatita se puede usar como se explica a continuación.

*Cromatografía de hidroxiapatita*

El tampón de las fracciones combinadas por intercambio aniónico se intercambió mediante dilución con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM a pH 6,0. El scFv-TCR soluble y correctamente plegado se separó de los productos de degradación plegados de manera errónea cargando las fracciones combinadas diluidas (en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM a pH 6,0) en una columna de hidroxiapatita y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10-500 mM/NaCl 1 M sobre 6 volúmenes

de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones del pico (que eluyen a una conductividad ~20 mS/cm) se almacenaron a 4 °C.

#### *Cromatografía por afinidad*

5 Para algunas fusiones de scFv-TCR con un pl cercano a 6-6,5, la etapa de intercambio iónico no se puede usar pero se puede sustituir por una etapa de cromatografía por afinidad. La columna de cromatografía por afinidad hacia proteína L (Pierce, número de producto 89928) aísla y purifica ciertas clases de inmunoglobulina a través de sus cadenas ligeras kappa. La proteína L también se puede unir a fragmentos variables de una sola cadena (scFv). El  
10 tampón de las fracciones combinadas por intercambio aniónico se intercambié mediante dilución con PBS/azida sódica al 0,02 %. El scFv-TCR soluble y correctamente plegado se separó de los productos de degradación plegados de manera errónea cargando las fracciones combinadas diluidas en una columna de Proteína L y eluyendo la proteína unida con un gradiente de Glicina 0-25 mM a pH 2,3/azida sódica al 0,02 % sobre 3 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). El scFv-TCR eluyó muy tarde en el gradiente y el pH de las  
15 fracciones eluidas se neutralizó mediante adición de Tris a pH 8,1 (concentración final de Tris 100 mM a pH 8,1). Las fracciones del pico se almacenaron a 4 °C.

#### *Etapa final de purificación*

20 Las fracciones del pico de la segunda etapa de purificación se analizaron con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación. A continuación, las fracciones combinadas se concentraron para la etapa de purificación final, cuando el scFv-TCR soluble se purificó y se caracterizó usando una columna de filtración en gel Superdex S200 (GE Healthcare) equilibrada previamente en tampón de PBS (Sigma). El pico que eluye a un peso molecular relativo de aproximadamente 78 kDa se analizó con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación.  
25

Las construcciones de las Figuras 5, 6 y 7 se prepararon de una manera similar a la que se ha descrito para la construcción de la Figura 4:

30 La Figura 5 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de NY-ESO soluble que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 2, y que tiene el anticuerpo scFv anti CD3 UCHT-1 de SEQ ID No: 3 fusionado en el extremo N terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 2 a través de una secuencia conectora L2, en particular AHHSDDPSSKAPKAP (SEQ ID No: 5).

35 La Figura 6 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de NY-ESO soluble que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 2, y que tiene el anticuerpo scFv anti CD3 UCHT-1 de SEQ ID No: 3 fusionado en el extremo N terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 2 a través de una secuencia conectora L3, en particular GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No: 6).

40 La Figura 7 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de NY-ESO soluble que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 2, y que tiene el anticuerpo scFv anti CD3 UCHT-1 de SEQ ID No: 3 fusionado en el extremo C terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 2 a través de una secuencia conectora L4 que en este caso es el aminoácido individual S.

45 Las proteínas de fusión que tienen la cadena  $\alpha$  de TCR de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de TCR de scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 14, en la que el anti-CD3 scFv se fusiona con el extremo C-terminal de la cadena beta de TCR, o la cadena  $\alpha$  de TCR de SEQ ID No: 1 y la cadena  $\beta$  de TCR de scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 15, en la que el scFv anti-CD3 se fusiona con el extremo N-terminal de la cadena beta de TCR se prepararon de una manera similar a la que se ha descrito para las construcciones de las Figuras 4, 5, 6 y 7.  
50

#### **A2. TCR quimérico soluble con Citoquinas como Polipéptidos Efectores**

La SEQ ID No: 7 (Figura 8) es la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de un TCR que tiene la propiedad de unirse a un péptido obtenido a partir de insulina de murino, LYLVCGERG (SEQ ID NO: 8), presentado por el  
55 complejo H-2K<sup>d</sup> de murino. (LYLVCGERG- H-2K<sup>d</sup>), en el que C158 (usando la numeración de SEQ ID No: 7) sustituye a T48 de su región constante TRAC.

La SEQ ID No: 9 (Figura 9) es la secuencia de aminoácidos de la cadena beta del mismo TCR que se une al complejo LYLVCGERG- H-2K<sup>d</sup> de murino, en el que C171 (usando la numeración de SEQ ID No: 9) sustituye a S57  
60 de su región constante TRBC2.

El TCR de SEQ ID No: 7 y 9 es un TCR quimérico que consiste en una cadena alfa y beta de TCR, cada una comprendiendo una región variable de murino una región constante humana. La versión quimérica del TCR se construyó para mejorar los problemas de replegamiento encontrados con el TCR totalmente murino, y se mostró que  
65 el TCR quimérico tenía la misma afinidad que el TCR murino para el complejo H-2K<sup>d</sup> de péptido-murino obtenido a partir de insulina de murino.

La SEQ ID No: 10 (Figura 10) es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-4 de murino.

La SEQ ID No: 11 (Figura 11) es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-13 de murino.

La Figura 12 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de de insulina quimérico que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 7 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 9, y que tiene el IL-4 de murino de SEQ ID No: 10 fusionado en el extremo N terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 9 a través de la secuencia conectora L5, en particular GGEGGGP (SEQ ID No: 12).

La Figura 13 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de de insulina quimérico que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 7 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 9, y que tiene el IL-4 de murino de SEQ ID No: 10 fusionado en el extremo C terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 9 a través de la secuencia conectora L6, en particular GSGGP (SEQ ID No: 13).

La Figura 14 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de de insulina quimérico que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 7 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 9, y que tiene el IL-13 de murino de SEQ ID No: 11 fusionado en el extremo N terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 9 a través de la secuencia conectora L5, en particular GGEGGGP (SEQ ID No: 12).

La Figura 15 muestra en forma de diagrama de bloques la estructura de un TCR  $\alpha\beta$  de de insulina quimérico que tiene la cadena  $\alpha$  de SEQ ID No: 7 y la cadena  $\beta$  de SEQ ID No: 9, y que tiene el IL-13 de murino de SEQ ID No: 11 fusionado en el extremo C terminal de la cadena  $\beta$  de TCR de SEQ ID No: 9 a través de la secuencia conectora L6, en particular GSGGP (SEQ ID No: 13).

Las construcciones de las Figuras 12 - 15 se prepararon de la siguiente manera.

#### Ligamiento

Los genes sintéticos que codifican (a) la cadena  $\alpha$  de TCR de SEQ ID No: 7 y (b) la secuencia de fusión de SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10 o 11, se ligaron por separado en plásmidos de expresión basados en pGMT7, que contienen el promotor T7 para expresión de nivel elevado en la cepa BL21-DE3(pLysS) de *E. coli* (Pan *et al.*, Biotechniques (2000) 29 (6): 1234-8).

#### Expresión

Los plásmidos de expresión que contienen la cadena  $\alpha$  de TCR y citoquina – cadena  $\beta$ , respectivamente se transformaron por separado en la cepa BL21 (DE3) Rosetta pLysS de *E. coli*, y las colonias resistentes a ampicilina individuales se cultivaron a 37 °C en medio TYP (10  $\mu$ g/ml de ampicilina) con una DO<sub>600</sub> de ~0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteína con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción por centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en una centrifugadora J-6B de Beckman. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (NovaGen) en presencia de MgCl<sub>2</sub> y DNasa. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrifugadora J2-21 de Beckman. A continuación, se realizaron tres lavados con detergente para retirar los residuos celulares y los componentes de la membrana. Cada vez, el sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizaba en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, Triton-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM,) antes de sedimentar mediante centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en una centrifugadora J2-21 de Beckman. A continuación, se retiró el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Por último, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento de la proteína de cuerpos de inclusión se cuantificó por solubilización con guanidina-HCl 6 M y se tomó una medición de la DO en un espectrofotómetro U-2001 de Hitachi. A continuación, la concentración de proteínas se calculó usando el coeficiente teórico de extinción.

#### Replegamiento

Aproximadamente 20 mg de cadena  $\alpha$  de TCR y 40 mg cuerpos de inclusión solubilizados de cadena  $\beta$  de citoquina-TCR se descongelaron a partir de soluciones de reserva congeladas, diluidos en 20 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 20 mM), y se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 min-1 hr para asegurar la desnaturalización completa de la cadena. A continuación, la solución de guanidina que contenía cadenas de TCR totalmente reducidas y desnaturalizadas se inyectó en 1 litro de tampón de replegamiento frío (5-10 °C): Tris 100 mM a pH 8,1, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. El par redox (clorhidrato de cistamina y diclorhidrato de cistamina (a concentraciones finales de 10 mM y 2,5 mM, respectivamente)) se añadieron aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas  $\alpha$  de TCR y  $\beta$  de citoquina-TCR desnaturalizadas. La solución se dejó durante ~30 minutos. El citoquina-TCR replegado se dializó en membranas de celulosa con tubo de diálisis (Sigma-Aldrich; Producto N.º D9402) frente a 10 l de H<sub>2</sub>O

durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces a Tris 10 mM recién preparado a pH 8,1 (10 l) y la diálisis continuó a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante otras ~8 horas.

*Purificación*

- 5 La fusión de citoquina-TCR solubles se separó a partir de productos de degradación e impurezas mediante un método de purificación de 3 etapas a TA como se describe a continuación.

*Primera etapa de purificación*

- 10 El replegamiento dializado se filtró usando una cápsula Sartopore de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (Sartorius) antes de purificación en columna. El replegamiento filtrado se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM sobre 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones del pico que eluyen a NaCl 250 mM, que consisten en la proteína plegada correctamente, se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las fracciones del pico se analizaron con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación.
- 15

*Segunda etapa de purificación*

- 20 Las fracciones combinadas que contienen citoquina-TCR soluble se mezclaron con un volumen equivalente de Tris 50 mM/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M a pH 8 para dar una concentración final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y una conductividad de 75-80 mS/cm a TA. La citoquina-TCR soluble se separó de los productos de degradación impurezas cargando esta muestra en una columna de interacción hidrófoba de butilo (5 ml de HiTrap de GE Healthcare) equilibrada previamente (Tris 50 mM/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M a pH 8) y recogiendo el flujo continuo usando un purificador Akta (GE Healthcare). La muestra de flujo continuo que contenía la citoquina-TCR soluble se analizó con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación y se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 25

*Etapa final de purificación*

- 30 Las fracciones combinadas se diluyeron con un volumen equivalente de Tris 10 mM a pH 8 y se concentraron a 10 ml (concentración de  $\leq 3\text{ mg/ml}$ ). La citoquina-TCR soluble se purificó usando una columna de filtración en gel Superdex S200 (GE Healthcare) equilibrada previamente en tampón de PBS (Sigma). El pico que eluye a un peso molecular relativo de aproximadamente 63 kDa se analizó con SDS-PAGE teñido con Colorante Instant Blue (Novexin) antes de su combinación.

- 35 Ejemplo de referencia B. Propiedades de los TCR  $\alpha\beta$  solubles que tienen polipéptidos efectores fusionados con el extremo C- o N-terminal de la cadena  $\beta$  de TCR

B1. TCR de NY-ESO soluble con Anticuerpo Anti-CD3 como Polipéptido Efector

- 40 a. Redirección y activación de linfocitos CD8<sup>+</sup> T por el TCR de NY-ESO soluble fusionado con anticuerpo anti-CD3 frente a células de presentación de péptido NY-ESO

- 45 El siguiente ensayo se realizó para demostrar la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) mediante una fusión de scFv-TCR anti-CD3 a través de un complejo específico de péptido-MHC. La producción de IFN- $\gamma$ , tal como se mide usando el ensayo ELISPOT, se usó como una lectura para activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) y la evaluación de la potencia de la porción de scFv anti-CD3 de la fusión.

*Reactivos*

- 50 Medios de ensayo: FCS al 10 % (Gibco, N.º de Cat 2011-09), 88 % RPMI 1640 (Gibco, N.º de Cat 42401), glutamina al 1 % (Gibco N.º de Cat 25030) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco N.º de Cat 15070-063).

Péptido: (SLLMWITQV) disuelto inicialmente en DMSO (Sigma, N.º de cat D2650) a 4 mg/ml y congelado. Las células T2 se pulsaron con el péptido descrito y se usaron como células diana.

- 55 Tampón de lavado: PBS 0,01 M/Tween 20 al 0,05 %

- PBS (Gibco N.º de Cat 10010).

El kit Enzimático de ELISPOT de PVDF de IFN $\gamma$  Humano (Diacclone, Francia; N.º de Cat 856.051.020) contiene todos los otros reactivos requeridos. (Solución de anticuerpos de captura y detección, leche en polvo desnatada, BSA, estreptavidina-fosfatasa alcalina y BCIP/NBT así como las placas de 96 pocillos de ELISPOT de PVDF de IFN- $\gamma$  Humano)

- 60

*Método*

*Preparación de células diana*

- 65 Las células diana usadas en este método eran cualquiera de (1) células naturales de presentación de epítipo (tales como células Mel624 o Mel526) o (2) células T2 pulsadas con el péptido de interés, descritas en la sección de

reactivos. Las suficientes células diana (50 000 células/pocillo) se lavaron mediante centrifugación tres veces a 1200 rpm, 10 min en una Megafuge 1.0 (Heraeus). A continuación, las células se volvieron a suspender en medio de ensayo a  $10^6$  células/ml.

5 *Preparación de células efectoras*

Las células efectoras (linfocitos T) usadas en este método fueron cualquiera de linfocitos CD8<sup>+</sup> T (obtenidos por selección negativa (usando el Kit de Aislamiento Negativo de CD8, Dynal, N.º de Cat 113.19) de PBL), linfocitos T de una línea de células EBV o las PBMC. Las células efectoras se descongelaron y se colocaron en medio de ensayo antes de su lavado mediante centrifugación a 1200 rpm, 10 min en una Megafuge 1.0 (Heraeus). A continuación, las células se volvieron a suspender en medio de ensayo a una concentración final requerida de 4X.

*Preparación de reactivo/compuesto de ensayo*

15 Las concentraciones variables de compuestos de ensayo (las fusiones TCR-anti-CD3; de 10 nM a 0,03 pM) se prepararon por dilución en medio de ensayo para dar una concentración final de 4X.

*ELISPOT*

20 Las placas se prepararon de la siguiente manera: 100 µl de anticuerpo de captura anti-IFN-γ se diluyeron en 10 ml de PBS estéril por placa. A continuación, se tomaron alícuotas de 100 µl del anticuerpo de captura diluido en cada pocillo. A continuación, las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron (programa 1, placa de tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) para retirar el anticuerpo de captura. A continuación, las placas se bloquearon mediante la adición de 100 µl de leche desnatada al 2 % en PBS estéril a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, la leche desnatada se lavó de las placas (programa 1, placa de tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) y cualquier tampón de lavado restante se retiró girando rápidamente y dando golpecitos a las placas ELISPOT en una toalla de papel.

30 A continuación, los componentes del ensayo se añadieron a la placa ELISPOT en el siguiente orden:

- 50 µl de células diana  $10^6$  células/ml (dando un total de 50 000 células diana/pocillo)
- 50 µl de reactivo (las fusiones de scFv-TCR anti-CD3; concentraciones variables)
- 50 µl de medio (medio de ensayo)

35 50 µl de células efectoras (entre 1000 y 50000 células CD8<sup>+</sup>/pocillo; entre 500 y 1000 células EBV/pocillo; entre 1000 y 50000 PBMC/pocillo).

A continuación, las placas se incubaron durante la noche (37 °C / CO<sub>2</sub> al 5 %). Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces (programa 1, placa de tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) con tampón de lavado y se dan golpecitos en la toalla de papel para retirar el exceso de tampón de lavado. A continuación, se añaden a cada pocillo 100 µl de anticuerpo de detección primario. El anticuerpo de detección primario se preparó mediante la adición de 550 µl de agua destilada a un vial de anticuerpo de detección suministrado con el kit Diaclone. A continuación, se diluyeron 100 µl de esta solución en 10 ml de PBS/BSA al 1 % (el volumen requerido para una sola placa). A continuación, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 hr antes de ser lavadas tres veces (programa 1, placa de tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) con tampón de lavado, el exceso de tampón de lavado se retiró dando golpecitos a la placa en una toalla de papel.

La detección secundaria se realizó mediante la adición de 100 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida a cada pocillo e incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. La estreptavidina-fosfatasa alcalina se preparó mediante la adición de 10 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina a 10 ml de PBS/BSA al 1 % (el volumen requerido para una sola placa). A continuación, las placas se lavaron tres veces (programa 1, placa de tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) con tampón de lavado y se dieron golpecitos en una toalla de papel de aluminio para retirar el exceso de tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100 µl de solución de BCIP/NBT, tal como se suministra con el kit Diaclone, a cada pocillo. Durante el desarrollo, las placas se cubrieron en papel de aluminio y se dejaron durante 5 - 15 min. Las placas en desarrollo se comprobaron regularmente para aplicaciones puntuales durante este periodo de tiempo para determinar el tiempo óptimo para terminar la reacción. Las placas se lavaron en un fregadero de agua corriente para terminar el desarrollo de la reacción, y se secan agitando antes de su desmontaje en sus tres partes componentes. A continuación, las placas se secaron a 50 °C durante 1 hr antes de hacer el recuento de las aplicaciones puntuales que se han formado en la membrana usando un lector de placas Immunospot (CTL; Cellular Technology Limited).

*RESULTADOS*

65 Las construcciones de fusión de scFv-TCR anti-CD3 de las Figuras 4-7 se sometieron a ensayo con el ensayo ELISPOT (como se ha descrito anteriormente). El número de aplicaciones puntuales de ELISPOT observadas en cada pocillo se representó frente a la concentración de la construcción de ensayo usando Prism (Graph Pad). A

partir de estas curvas de dosis-respuesta, se determinaron los valores de CE<sub>50</sub> (los valores de CE<sub>50</sub> se determinan a la concentración de la fusión de scFv-TCR anti-CD3 que induce un 50 % de la respuesta máxima).

Construcción de Ensayo	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
Fig 7 <i>Fusión C-terminal</i>	5,044e-9	1,864e-9	2,383e-9
Fig 5 <i>Fusión N-terminal</i>	8,502e-11		
Fig 4 <i>Fusión N-terminal</i>		4,825e-11	
Fig 6 <i>Fusión N-terminal</i>			3,95e-11

5 Estos resultados muestran que las construcciones N-fusionadas de las Figuras 4, 5 y 6 eran al menos 2 veces más potentes en su capacidad para activar los linfocitos T citotóxicos que la construcción C-fusionada de la Figura 7.

b. Redirección de linfocitos CD8<sup>+</sup> T por el TCR de NY-ESO soluble fusionado un anticuerpo anti-CD3 para eliminar la línea de linfocitos B transformados por IM9 EBV (ensayo de citotoxicidad no radiactivo)

10 El siguiente ensayo se realizó para demostrar la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) mediante una fusión TCR-anti-CD3 a través de un complejo específico de péptido-MHC y la evaluación de la potencia de la porción de scFv anti-CD3 de la fusión para activar los CTL para eliminar las células IM9. Este ensayo es una alternativa colorimétrica para los ensayos de citotoxicidad de liberación de <sup>51</sup>Cr y mide de forma cuantitativa la lactato deshidrogenasa (LDH) que es una enzima que se libera después de la lisis celular. La LDH liberada en sobrenadantes de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto de rojo formazán. La cantidad de color formada es proporcional al número de células plisadas. Los datos de absorbancia se recogen usando un lector de placas de 96 pocillos convencional a 490 nm.

20 **Materiales**

- Ensayo de Citotoxicidad No Radiactivo CytoTox96® (Promega) (G1780) contiene Mezcla de Sustrato, Tampón de Ensayo, Solución de Lisis, y Solución de Parada
- 25 - Medio de ensayo: FCS al 10 % (inactivado por calor, Gibco, N.º de cat 10108-165), RPMI 1640 al 88 % sin rojo fenol (Invitrogen, N.º de cat 32404014), glutamina al 1 %, 200 mM (Invitrogen, N.º de cat 25030024), penicilina/estreptomina al 1 % (Invitrogen N.º de cat 15070063)
- Placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo de micropocillo Nunc (Nunc, N.º de cat 163320)
- 30 - Placas Maxisorb Nunc-Immuno (Nunc, N.º de cat 442404).

**Método**

**Preparación de células diana**

35 Las células diana usadas en este método eran la línea de linfocitos B transformada por IM9 EBV obtenida a partir de un paciente de mieloma múltiple (HLA-A2<sup>+</sup> NY-ESO<sup>+</sup>). La línea de células de melanoma Mel526 se usó como un control y es HLA-A2<sup>+</sup> NY-ESO<sup>-</sup>. Las células diana se prepararon en medio de ensayo: la concentración de células diana se ajustó a 2 x 10<sup>5</sup> células/ml para dar 1 x 10<sup>4</sup> células / pocillo 50 µl.

40 **Preparación de células efectoras**

Las células efectoras usadas en este ensayo eran linfocitos CD8<sup>+</sup> T. La proporción de efector con respecto a diana usada era 10:1 (2 x 10<sup>6</sup> células/ml para dar 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en 50 µl).

45 **Preparación de reactivo/compuesto de ensayo**

Las concentraciones variables de las fusiones de of the NY-ESO TCR-anti-CD3, que tienen la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta de TCR de SEQ ID No: 14, o que tienen la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta de TCR de SEQ ID No: 15, se prepararon como se ha descrito en el ejemplo A1 y se prepararon para este ensayo por dilución (concentración final de 10<sup>-13</sup> a 10<sup>-8</sup> M) en medio de ensayo.

**Preparación del ensayo**

55 Los componentes del ensayo se añadieron a la placa en el siguiente orden:

- 50 µl de células diana, IM9 o Mel526 (preparadas como se ha explicado anteriormente), a cada pocillo.

- 50 µl de reactivo (preparado como se ha explicado anteriormente) a cada pocillo.
- 50 µl de células efectoras (preparadas como se ha explicado anteriormente) a cada pocillo. Varios controles se prepararon cómo se explica a continuación:
- 5 - Liberación espontánea del efector: 50 µl de células efectoras solo.
- Liberación espontánea de células diana: 50 µl de células diana solo.
- 10 - Liberación máxima de diana: 50 µl de células diana más 80 ug/ml de digitonina al comienzo del ensayo para lisar las células
- Control del medio de ensayo: 105 µl de medio solo.
- 15 Los pocillos experimentales se preparan por triplicado y los pocillos de control por duplicado en un volumen final de 150 µl.

La placa se centrifugó a 250 x g durante 4 minutos y a continuación se incubó a 37 °C durante 24 horas.

- 20 La placa se centrifugó a 250 x g durante 4 minutos. A continuación, 37,5 µl del sobrenadante de cada pocillo de la placa de ensayo se transfirieron al pocillo correspondiente de una placa Nunc Maxisorb de 96 pocillos de fondo plano. La mezcla de sustrato se reconstituyó usando tampón de ensayo (12 ml). 3 a continuación, se añadieron 37,5 µl de la mezcla de sustrato a cada pocillo de la placa. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 37,5 µl de solución de parada a cada pocillo de la placa para parar la reacción. La absorbancia a 490 nm se registró en un lector de placas de ELISA en una hora después de la adición de la solución de parada.
- 25

*Cálculo de resultados*

- 30 El promedio de los valores de la absorbancia del fondo del medio de cultivo se resto de todos los valores de absorbancia de Liberación Experimental, Liberación Espontánea de Células Diana y Liberación Espontánea de Células Efectoras y Liberación Máxima de Diana.

- 35 Los valores corregidos obtenidos en las primeras dos etapas se usaron en la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de toxicidad:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 \times (\text{Experimental} - \text{Espontánea Efectora} - \text{Espontánea Diana}) / (\text{Liberación Máxima de Diana} - \text{Espontánea de Diana})$$

*Resultados*

- 40 Las construcciones de fusión de scFv-TCR anti-CD3 de NY-ESO que tienen (i) la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta TCR de SEQ ID No: 14 (fusión C-terminal) o (ii) la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta TCR de SEQ ID No: 15 (fusión N-terminal) se sometieron a ensayo mediante el ensayo de liberación de LDH (como se ha descrito anteriormente). El % de citotoxicidad observado en cada pocillo se representó frente a la concentración de la construcción de ensayo usando Prism (Graph Pad). A partir de estas curvas de dosis-respuesta, se determinaron los valores de CE<sub>50</sub> (los valores de CE<sub>50</sub> se determinan a la concentración de la fusión de TCR que induce un 50 % de la respuesta máxima).
- 45

Construcción de Ensayo	CE <sub>50</sub>
fusión C-terminal (SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 14)	1,2e <sup>-9</sup>
fusión N-terminal (SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 15)	3,2e <sup>-11</sup>

- 50 Estos resultados muestran que la fusión N-terminal que comprende la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta TCR de SEQ ID No: 15 era al menos 2 veces más potente en su capacidad para redirigir los linfocitos T citotóxicos para eliminar las células diana que la construcción de fusión C-terminal que comprende la cadena alfa de TCR de SEQ ID No: 1 y la fusión de scFv anti-CD3 de cadena beta TCR de SEQ ID No: 14.
- 55

B2. TCR quimérico soluble con Citoquinas como Polipéptidos Efectores

a. Citoquina de IL-4 murino como polipéptido efector

El siguiente ensayo se usó para someter a ensayo la actividad biológica de la porción de citoquina de las construcciones de fusión de IL-4 -TCR de murino de las Figuras 12-13. Se trata de un bio ensayo que usa la línea de células de murino, CTLL-2, que son dependientes de IL-4 de murino para su crecimiento y en el presente documento se usan para demostrar la actividad biológica de la porción de citoquina de una fusión IL-4 - TCR de murino.

*Materiales*

Células CTLL-2, ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® de Promega (N.º de Cat G7572) que incluye Tampón CellTiter-Glo® y Sustrato CellTiter-Glo® (liofilizado)

Medio de ensayo: RPMI suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Gibco, N.º de cat 10108-165), RPMI 1640 al 88 % (Gibco, N.º de cat 42401-018), glutamina al 1 % (Gibco, N.º de cat 25030-024), penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, N.º de cat 15070-063).

Las células CTLL-2 se recogieron, se lavaron una vez en medio de ensayo (se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 mins), se hizo su recuento y la viabilidad se evaluó usando solución de azul de Tripano. Si la viabilidad será inferior a un 80 %, se realizaba un gradiente de ficoll para retirar las células muertas (800 xg durante 15 mins con desprendimiento). Las células se lavaron dos veces más y el volumen sea justo para dar un volumen final de  $1 \times 10^5$  células/ml. Las células CTLL-2 se añadieron a una placa Nunc de 96 pocillos de fondo plano de color blanco (5000 células/pocillo), seguido por 50 µl de concentraciones valoradas de IL-4 murino patrón (PeproTech), o construcciones de fusión IL-4 -TCR quimérico de murino de las Figuras 12 y 13 (7 puntos de 1 en 10 dilución es, de  $10^{-8}$  a  $10^{-14}$  M). Los controles incluían solo células, solo medio de ensayo, y células con 200 U/ml de Proleuquina (Chiron). La placa se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche. Siguiendo las instrucciones del fabricante, el reactivo CellTiter-Glo se descongeló y se añadió a la placa (100 µl por pocillo). La placa se incubó durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente y a continuación se registró usando el lector de luminiscencia. La señal de fondo (solo células) se restó de las lecturas y un gráfico representado en Prism (Graph Pad) de modo que las CE<sub>50</sub> de las construcciones de fusión de IL-4 - TCR de murino de las Figuras 12 y 13 se pueden comparar con el IL-4 de murino recombinante 'libre'.

*Resultados*

Construcción de Ensayo	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
m-IL4	4,984e-13	3,767e-13	5,148e-13
Figura 13 fusión C-term	7,464e-12		
Figura 12 fusión N-term		5,913e-13	8,897e-13

Estos resultados muestran que la construcción N-fusionada de la Figura 12 era al menos 2 veces más potente en su capacidad para activar la proliferación celular de la construcción C-fusionada de la Figura 13.

b. Citoquina IL-13 de murino como polipéptido efector

El siguiente ensayo se usó para someter a ensayo la actividad biológica de la porción de citoquina de las construcciones de fusión de IL-13 - TCR de murino de las Figuras 14-15.

Este ensayo se realizó para demostrar la actividad de la porción de citoquina de una fusión de citoquina-TCR, es decir, la inhibición de la producción de IL-1β por monocitos humanos. Este ensayo se puede usar para someter a ensayo las fusiones de citoquina-TCR en las que la citoquina es IL-13 de murino.

*Materiales*

Monocitos obtenidos a partir de capas leucocíticas (capas leucocíticas del Servicio de Transfusión de NBS Bristol) Kit 2 de Monocitos Dynabeads MyPure de Dynal para células humanas intactas (113.35) Medio de ensayo: suero bovino fetal al 10 % (inactivado por calor, Gibco, N.º de cat 10108-165), RPMI 1640 al 88 % (Gibco, N.º de cat 42401-018), glutamina al 1 % (Gibco, N.º de cat 25030-024), penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, N.º de cat 15070-063)

Tampón de lavado: PBS 0,01 M/Tween 20 al 0,05 % (1 sobrecito de solución salina tamponada con fosfato con Tween 20, pH 7,4 de Sigma, N.º de cat P-3563 disuelto en 1 litro de agua destilada da una composición final de PBS 0, 01 M, NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M, Tween 20 al 0,05 %).

PBS (Gibco, N.º de cat 10010-015).

HBSS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (Gibco, N.º de cat 1018-165)

Kits para ELISA Eli-pair de Citoquina: IL-1β (Diacclone N.º de cat DC-851.610.020) estos kits contienen los otros reactivos necesarios, es decir, anticuerpo de captura, anticuerpo biotinilado de detección, estreptavidina-HRP,

patrones de IL-1 $\beta$ , TMB listo para usar. El siguiente método se basa en las instrucciones proporcionadas con cada kit.

Placas Maxisorb Nunc-Immuno (Nunc, N.º de cat 442404).

Placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo de micropocillos Nunc (Nunc, N.º de cat 163320)

5 BSA (Sigma, N.º de cat A3059)

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma N.º de cat S1526)

Azul de Tripano (Sigma N.º de cat T8154)

Lipopolisacáridos (LPS) obtenidos a partir de la cepa 0111:B4 de *E. coli* (Sigma, N.º de cat L4391), patrón de IL-13 de murino recombinante (Peprotech, N.º de cat 210-13) usado cuando los reactivos de fusión de IL-13-TCR de murino se someten a ensayo.

10

#### *Aislamiento de monocitos*

Las PBMC se aislaron a partir de capas leucocíticas: una capa leucocítica se diluyó 1 en 2 con HBSS (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>), la sangre diluida se depositó en capas en Lymphoprep (hasta 35 ml de sangre con respecto a 15 ml de Lymphoprep) y se centrifugó durante 15 min a 800 x g (temp ambiente) con el desprendimiento; las células en la superficie de contacto se retiraron y se lavaron cuatro veces con HBSS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Después del lavado final, las células se volvieron a suspender en 50 ml de medio de ensayo y se hizo su recuento y la viabilidad se evaluó usando una solución de azul de Tripano. Kit 2 de Monocitos Dynabeads MyPure de DYNAL se usó para aislar los monocitos. Las PBMC se volvieron a suspender en PBS/BSA al 0,1 % en 100  $\mu$ l de tampón por 10<sup>7</sup> células, 20  $\mu$ l de Reactivo de Bloqueo por 10<sup>7</sup> células y se añadieron 20  $\mu$ l de Mezcla de Anticuerpos por 10<sup>7</sup> células y las células se incubaron durante 20 min a 4 °C. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en 0,9 ml de PBS/BSA al 0,1 % por 10<sup>7</sup> células. Las perlas lavadas previamente se añadieron (100  $\mu$ l por 10<sup>7</sup> células), se mezclaron y se incubaron durante un periodo adicional de 15 min a 20 °C con rotación suave. Las rosetas se volvieron a suspender mediante pipeteo con cuidado y se añadió 1 ml de de PBS/BSA al 0,1 % por 10<sup>7</sup> células. El tubo se colocó en el imán Dynal durante 2 minutos. El sobrenadante que contenía células aisladas de forma negativa se transfirió a un tubo fresco y se hizo el recuento. Las células se usaron inmediatamente o se congelaron en FCS al 90 %/DMSO al 10 % para su uso en el futuro.

15

20

25

#### 30 *Preparación de ensayo celular*

La placa de ensayo ELISA se revistió con 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de captura de IL-1 $\beta$  en PBS y se dejó a 4 °C durante la noche. Los monocitos se descongelaron, se lavaron dos veces en medio de ensayo y se volvieron a suspender a 5 x 10<sup>5</sup> células/ml. Los monocitos se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (100  $\mu$ l por pocillo, es decir, 5 x 10<sup>4</sup> por pocillo). LPS, citoquina recombinante de Peprotech y proteínas de fusión de citoquina-TCR de ensayo se prepararon por dilución en medio de ensayo para dar una concentración final de 4X. En cada pocillo se añadió LPS (10 ng/ml final) seguido por 50  $\mu$ l de concentraciones valoradas (6 puntos de 1 en 10 dilución es en serie) de IL-13 recombinante de Peprotech (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-13</sup> M final) o proteínas de fusión de citoquina - TCR de ensayo (10<sup>-7</sup> a 10<sup>-13</sup> M final) en pocillos por triplicado. La placa se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche.

35

40

#### *ELISA de IL-1 $\beta$*

La placa de ELISA de IL-1 $\beta$  revestida con anticuerpo se lavó tres veces en tampón de lavado y se bloqueó con 250  $\mu$ l de PBS/BSA al 5 %/pocillo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). La placa de ELISA se lavó tres veces en tampón de lavado y se secó con golpecitos. Los patrones de IL-1 $\beta$  se diluyeron en PBS/BSA al 0,1 %. La placa que contenía las células se centrifugó a 1200 rpm durante 5 mins. El sobrenadante de cada pocillo se transfirió a continuación a la placa de ELISA de IL-1 $\beta$  revestida previamente. Se añadieron 100  $\mu$ l de sobrenadante celular (diluido a 1 en 3 con PBS/BSA al 0,1 %) o patrón a los pocillos relevantes y se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo de detección/pocillo (dilución de acuerdo con las instrucciones del kit). La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces en tampón de lavado. Se añadieron 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP por pocillo (dilución de acuerdo con las instrucciones del kit) y las placas se incubaron a temp ambiente durante 20 min. Las placas se lavaron tres veces en tampón de lavado. Se añadieron 100  $\mu$ l TMB de listo para usar por pocillo y se dejó que las placas se desarrollarán durante 5 - 20 min (dependiendo de la fuerza de la señal) en la oscuridad (con papel de aluminio). La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

45

50

55

La absorbancia de las placas se leyó en un lector de microplacas a 450 nm y con filtro de referencia ajustado a 650 nm. La cantidad de inhibición para cada punto de valoración se calcula como un porcentaje de la muestra que contiene monocitos y LPS sin proteína de fusión de citoquina - TCR que da la señal máxima, produciendo de este modo una curva de dosis-respuesta.

60

65

*Resultados*

Construcción de Ensayo	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
m-IL13	1,535e-10	9,534e-11
Figura 15 fusión C-term	6,21e-10	
Figura 14 fusión N-term		1,493e-10

5

Estos resultados muestran que la construcción N-fusionada de la Figura 14 era al menos 2 veces más potente en su capacidad para inhibir la producción de IL-1 $\beta$  por monocitos humanos que la construcción C-fusionada de la Figura 15.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula bifuncional que comprende un compañero de unión a polipéptido específico para un epítipo de pMHC dado, y un polipéptido efector inmunológico, estando el extremo N-terminal del compañero de unión a pMHC unido al extremo C-terminal del polipéptido efector inmunológico, en la que el compañero de unión a polipéptido es un anticuerpo.
- 10 2. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 1, en la que el compañero efector inmunológico es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno presentado por un linfocito T.
3. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 2, en la que el anticuerpo es un anticuerpo scFv.
- 15 4. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 2 o en la reivindicación 3, en la que el polipéptido efector inmunológico es un anticuerpo anti-CD3.
5. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 4, en la que el polipéptido efector inmunológico es OKT3.
- 20 6. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 4, en la que el polipéptido efector inmunológico es UCHT-1.
7. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 4, en la que el polipéptido efector inmunológico es BMA031.
- 25 8. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 4, en la que el polipéptido efector inmunológico es 12F6.
9. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 1, en la que el polipéptido efector inmunológico es una citoquina que modula la actividad inmunosupresora o inmunoestimuladora de los linfocitos.
- 30 10. Una molécula bifuncional como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en la que el compañero de unión a polipéptido y el polipéptido efector inmunológico se unen directamente.
- 35 11. Una molécula bifuncional como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el compañero de unión a polipéptido y el polipéptido efector inmunológico se unen indirectamente mediante una secuencia conectora.
- 40 12. Una molécula bifuncional como se reivindica en la reivindicación 11, en la que la secuencia conectora tiene una longitud menor de 12, menor de 10 o de 5 a 10 aminoácidos.

FIG 1

SEQ ID No: 1 - secuencia de aminoácidos de cadena alfa de TCR de NY-ESO

10	20	30	40
*	*	*	*
KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDP			
50	60	70	80
*	*	*	*
GKGLTSLLLITPWQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAAS			
90	100	110	120
*	*	*	*
QPGDSATYLCAVRPLLDGTYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPD			
130	140	150	160
*	*	*	*
PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD			
170	180	190	200
*	*	*	*
K <u>C</u> VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT			
FFPSPSS			

FIG 2

SEQ ID No: 2 - secuencia de aminoácidos de cadena beta de NY-ESO

	10	20	30
	*	*	*
	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQD		
40	50	60	70
*	*	*	*
PGMGLRLIHYSVAIQTTDQGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRL			
80	90	100	110
*	*	*	*
LSAAPSQTSVYFCASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKN			
120	130	140	150
*	*	*	*
VFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW			
160	170	180	190
*	*	*	*
WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSA			
200	210	220	230
*	*	*	*
TFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSA			
240			
*			
EAWGRAD			

FIG 3

SEQ ID No: 3 - secuencia de aminoácidos de scFv de UCHT-1 (con la secuencia intraconectora subrayada):

```

      10          20          30          40
      *          *          *          *
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKP
      50          60          70          80
      *          *          *          *
GKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPE
      90          100         110         120
      *          *          *          *
DFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKRTSGPGDGGKGGP
      130         140         150
      *          *          *
GKGGGGEGTKGTGPGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
      160         170         180         190
      *          *          *          *
AASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYN
      200         210         220         230
      *          *          *          *
QKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGY
      240         250
      *          *
YGDSDWYFDVWGGGTLVTVSS
    
```

FIG 4

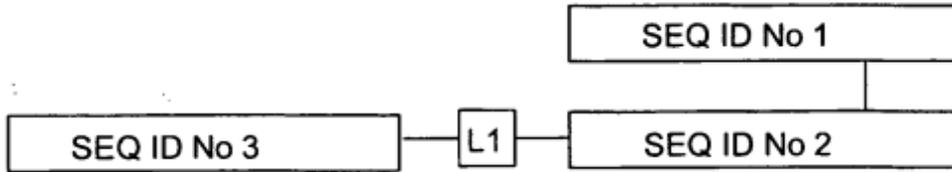


FIG 5

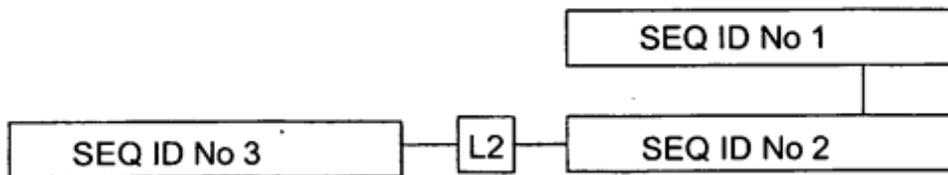


FIG 6

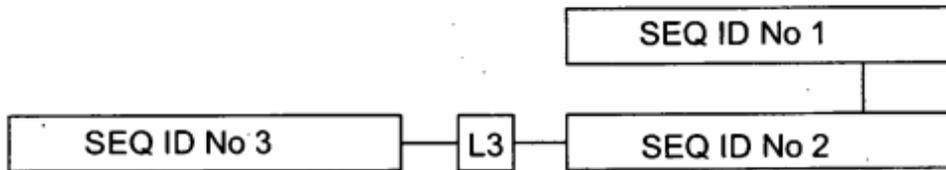


FIG 7

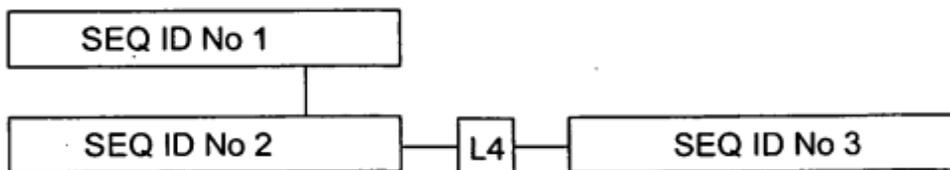


FIG 8

SEQ ID No: 7 - secuencia de aminoácidos de cadena alfa de TCR de insulina de Wong quimérica

```

          10          20          30
          *          *          *
SQLAEENPWALSVHEGESVTVNCSYKSPMINLQWYRQKS
40          50          60          70          80
*          *          *          *          *
GEGPAQLILIRSNEREKRNGLRATLDTSSQSSLSITATR
          90          100          110          120
          *          *          *          *
SEDTAVYFCATDPLGYILTFGTGTSLLVDPNIQNPDAVY
          130          140          150          160
          *          *          *          *
QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVL
          170          180          190          200
          *          *          *          *
DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
    
```

PESS

**FIG 9**

**SEQ ID No: 9 - secuencia de aminoácidos de cadena beta de TCR de insulina de Wong quimérica**

```

      10          20          30          40
      *          *          *          *
GGIITQTPKFLIGQEGQKLTCLKCQQNFNHDTMYWYRQDSG
      50          60          70          80
      *          *          *          *
KGLRLIYYSLLAGHLQKGDLSSEGYDASREKKSSFSLTVTS
      90          100         110         120
      *          *          *          *
TQKNEMAVFLCASSKRKNGAETLYFGSGTRLTVLEDLKNV
      130         140         150         160
      *          *          *          *
FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWW
      170         180         190
      *          *          *
VNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSAT
200          210          220          230
*          *          *          *
FWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAE
240
*
AWGRAD

```

**FIG 10**

**SEQ ID No: 10 - secuencia de aminoácidos de IL-4 murino**

HIHGCDKNHLREIIGILNEVTGEGTPCTEMDVPNVLTATKNTTESELVCRASKVLRIF  
YKKGKTPCLKKNSSVLMELQRLFRAFRCCLDSSISCTMNESKSTSLKDFLESLSIM  
QMDYS

**FIG 11**

**SEQ ID No: 11 - secuencia de aminoácidos de IL-13 murino**

GPVPRSVSLPLTLKELIEELSNITQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCVALDSLTNIS  
NCNAIYRTQRILHGLCNRKAPTTVSSLPDTKIEVAHFITKLLSYTKQLFRHGPF

FIG 12

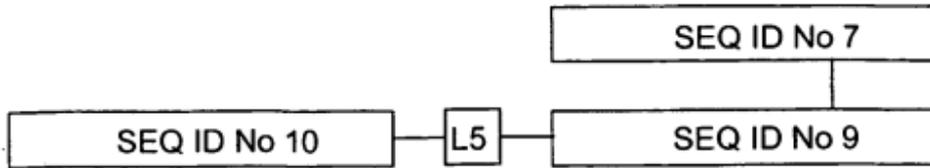


FIG 13

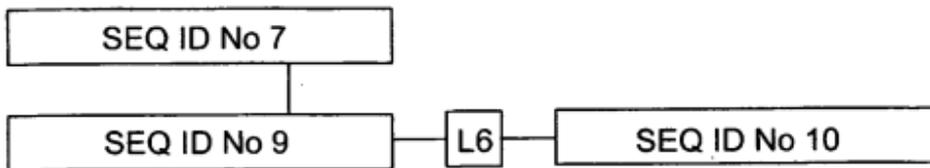


FIG 14

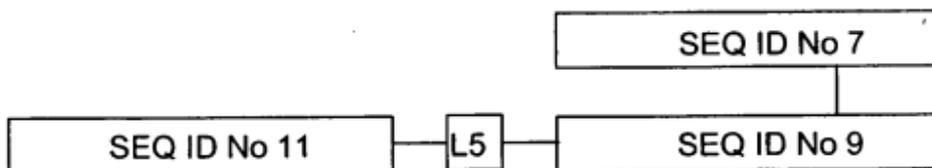
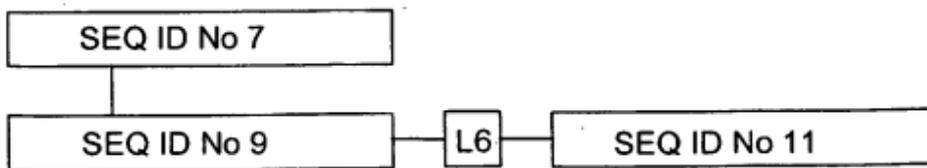


FIG 15



**FIG 16**

SEQ ID No: 14 - Secuencia de aminoácidos de cadena beta de TCR de NY-ESO fusionada con scFv anti-CD3, estando scFv anti-CD3 fusionado al extremo C-terminal de la cadena beta de TCR a través de un conector peptídico:

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVAIQTT  
DQGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYLGNTGELFFGEGSRLT  
VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHS  
GVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDE  
WTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADGGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD  
IRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT  
YYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTY  
NQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGSDSDWYFDWVGQ  
GTLVTVSS

**FIG 17**

SEQ ID No: 15 - Secuencia de aminoácidos de cadena beta de TCR de NY-ESO fusionada con scFv anti-CD3, estando scFv anti-CD3 fusionado al extremo N-terminal de la cadena beta de TCR a través de un conector peptídico:

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESG  
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGS  
GGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTM  
NWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAE  
DTAVYYCARSGYGSDSDWYFDWVGQTLVTVSSGGGGSNAGVTQTPKFQVLKTG  
QSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVAIQTTDQGEVPNGYNVSRSTI  
EDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFE  
PSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN  
DSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEA  
WGRAD