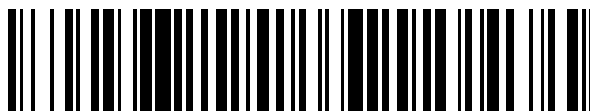


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 406**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/US2014/066903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14863490 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3071593**

54 Título: **Receptores de linfocitos T humanos de alta afinidad modificados**

30 Prioridad:

22.11.2013 US 201361907887 P

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

04.11.2019

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (50.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street
Urbana, IL 61801, US y
FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SMITH, SHEENA N.;
HARRIS, DANIEL T.;
KRANZ, DAVID M.;
SCHMITT, THOMAS M. y
GREENBERG, PHILIP D.**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 729 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T humanos de alta afinidad modificados

5 **Sector de la técnica**

La divulgación se refiere a receptores de linfocitos T (TCR) contra el antígeno del tumor de Wilm (WT1), que incluye TCRs de alta afinidad manipulados por técnicas *in vitro*, así como a métodos de producción de TCRs modificados y TCRs monocatenarios y los usos correspondientes de los TCRs para métodos terapéuticos, de diagnóstico y de obtención de imágenes.

Estado de la técnica

Los receptores de linfocitos T (TCRs) y anticuerpos son moléculas que se han desarrollado para reconocer diferentes clases de antígenos (ligandos) ((Murphy (2012), xix, 868 p.)). Los TCRs son moléculas específicas de antígeno que son responsables de reconocer péptidos antigénicos presentados en el contexto de un producto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs) o cualquier célula nucleada (por ejemplo, todas las células humanas en el cuerpo, excepto los glóbulos rojos). A diferencia, los anticuerpos normalmente reconocen antígenos solubles o de la superficie celular, y no requieren la presentación del antígeno por un MHC. Este sistema otorga a los linfocitos T, mediante sus TCRs, la posible capacidad para reconocer toda la matriz de antígenos intracelulares expresados por una célula (incluyendo proteínas de virus) que se procesan intracelularmente en péptidos cortos, unidos a una molécula de MHC intracelular, y se suministra a la superficie como un complejo péptido-MHC (pepMHC). Este sistema permite que prácticamente cualquier proteína extraña (por ejemplo, antígeno de cáncer mutado o proteína de virus) o proteína aberrantemente expresada sirva de diana para los linfocitos T (revisado en (Davis y Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402; Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868 p.)).

La interacción de un TCR y un pepMHC puede conducir al linfocito T a diversos estados de activación, dependiendo de la afinidad (o velocidad de disociación) de la unión. El proceso de reconocimiento de TCR permite que un linfocito T discrimine entre una célula sana normal y, por ejemplo, una que se ha transformado mediante un virus o tumor maligno, proporcionando un diverso repertorio de TCRs, en el que existe una alta probabilidad de que uno o más TCRs esté presente con una afinidad de unión para el péptido extraño unido a una molécula de MHC que está por encima del umbral para estimular la actividad de linfocitos T (Manning y Kranz (1999) Immunology Today, 20, 417-422).

Hasta la fecha, se ha mostrado que los TCRs no mutados aislados de cualquiera de clones de linfocitos T humanos o de ratón que se identificaron por cultivo *in vitro* tienen afinidades de unión relativamente bajas ($K_d = 1 - 300 \mu\text{M}$) (Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544). Parte de la explicación de esto parece ser que los linfocitos T que se desarrollan en el timo se seleccionan negativamente (inducción de tolerancia) en ligandos auto-pepMHC, de forma que se delecionan los linfocitos T con afinidad demasiado alta (Starr et al. (2003) Annu Rev Immunol, 21, 139-76). Para compensar estas afinidades relativamente bajas, los linfocitos T han desarrollado un sistema de co-receptores en el que las moléculas de la superficie celular CD4 y CD8 se unen a las moléculas de MHC (clase II y clase I, respectivamente) y sinergizan con TCR en mediar en la actividad de señalización. CD8 es particularmente eficaz en este proceso, permitiendo que TCRs con muy baja afinidad (por ejemplo, $K_d = 300 \mu\text{M}$) medien en la potente actividad específica de antígeno.

In vitro, se ha usado evolución dirigida para generar TCRs con mayor afinidad por un pepMHC específico. Los tres métodos de presentación diferentes que se han usado son presentación en levadura (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), presentación en fagos (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) y presentación en linfocitos T (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). En los tres enfoques, el proceso implica manipular, o modificar, un TCR que presenta la baja afinidad normal del TCR no mutante, de manera que la afinidad de mutantes del TCR tengan elevada afinidad por el pepMHC relacionado (el antígeno original para el que los linfocitos T fueron específicos). Así, se usó el TCR no mutante como molde para producir bibliotecas mutagenizadas en una o más de las CDRs, y se seleccionaron mutantes con mayor afinidad por unión al antígeno de péptido-MHC relacionado.

En la presente divulgación, se desvela un receptor de linfocitos T no mutante y receptores de linfocitos T de alta afinidad específicos para el tumor 1 de Wilm (WT1) manipulado por presentación en levadura. WT1 es un factor de transcripción que se ha descrito que funciona tanto como un supresor tumoral como un oncogén. WT1 se expresa a altos niveles en leucemia, así como una variedad de tumores sólidos (Sugiyama et al. (2010) Japanese Journal of Clinical Oncology 40(5) 377-387). Ha sido la diana de esfuerzos de vacunas, y diversos enfoques adoptivos de linfocitos T usando linfocitos T con receptores de linfocitos T no mutantes.

WT1 se ha clasificado en el número 1 en una lista de priorización de los 75 principales antígenos del cáncer por el Instituto Nacional del Cáncer (Cheever et al. (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-5337). Por consiguiente, existe una necesidad de identificar agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que se dirijan específicamente a este antígeno

del cáncer. La presente invención proporciona TCRs de afinidad más alta manipulados *in vitro*, que se pueden usar, por ejemplo, en forma soluble para administración elegida como diana *in vivo* o como genes introducidos en linfocitos T en un entorno adoptivo de linfocitos T. Sheena N smith et al. (Engineering high-affinity human single-chain T cell receptors against cancer antigens; 1 de enero de 2013) informan de que un TCR no mutante específico para el antígeno de melanoma MART1/Melan-A y un TCR no mutante específico para el antígeno de tumor de Wilm, que usa naturalmente la región Valfa2 altamente estable, se manipularon supuestamente para alta afinidad contra sus antígenos de péptido respectivos mediante presentación en levadura y citometría celular activada por fluorescencia.

David H Aggen et al. (Identification and engineering of human variable regions that allow expression of stable single-chain T cell receptors; Protein Engineering, Design & Selection: PEDS; 1 de abril de 2011; páginas 361-372) informan de que fragmentos de scTv pueden servir de plataforma para manipular TCRs con diversas especificidades, y posiblemente para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

Objeto de la invención

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un receptor de linfocitos T modificado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1.

La presente divulgación se refiere a un receptor de linfocitos T no mutante contra el antígeno WT1, y receptores de linfocitos T (TCR) manipulados *in vitro* que se unen al antígeno WT1 con afinidad mejorada. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a las secuencias del receptor de linfocitos T no mutante y las mutaciones estabilizantes y de afinidad seleccionadas mediante la presentación de bibliotecas sobre la superficie de células de levadura, fago o mamífero; a proteínas de TCR seleccionadas de estas bibliotecas para unirse a un antígeno con elevada afinidad; y al uso de TCR seleccionados *in vitro* derivados para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico u obtención de imágenes.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un receptor de linfocitos T, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende V α y a V β derivadas de un clon de linfocitos T, en el que el receptor de linfocitos T se une a un complejo del péptido WT1 y la molécula HLA-A2, y en el que el receptor de linfocitos T comprende la secuencia de aminoácidos de V β expuesta en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de V α expuesta en SEQ ID NO: 2. En un ejemplo, una célula hospedadora que expresa el receptor de linfocitos T. En un ejemplo adicional, la célula hospedadora es un linfocito T humano.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un receptor de linfocitos T modificado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende V α y V β derivadas de receptor de linfocitos T no mutante, en el que V α , V β , o ambas, comprenden una mutación en una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) con respecto al receptor de linfocitos T no mutante, en el que el receptor de linfocitos T modificado se une al antígeno de péptido/MHC conocido como WT1/HLA-A2 (el péptido WT1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 6), unido al producto de MHC conocido como HLA-A2).

En un ejemplo, el receptor de linfocitos T comprende V β que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de V β expuesta en SEQ ID NO: 1, en el que el receptor de linfocitos T media en la actividad por unión a WT1/HLA-A2.

En otro ejemplo, el receptor de linfocitos T modificado comprende una V β modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de V β expuesta en SEQ ID NO: 3, en el que el receptor de linfocitos T modificado se une a WT1/HLA-A2 con una afinidad (valor K_A) de 10⁶ M mayor.

En otro ejemplo, el receptor de linfocitos T comprende una V α que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de V α expuesta en SEQ ID NO: 2, en el que el receptor de linfocitos T media en la actividad por unión a WT1/HLA-A2.

En otro ejemplo, el receptor de linfocitos T modificado comprende una V α modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de V α expuesta en SEQ ID NO: 4, en el que el receptor de linfocitos T modificado se une a WT1/HLA-A2 con una afinidad (valor K_A) de 10⁶ M mayor.

En un ejemplo, el receptor de linfocitos T es un receptor de linfocitos T monocatenario que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En un ejemplo, el receptor de linfocitos T contiene al menos una de las mutaciones en CDR3 β seleccionadas de S95T, S97N, I103Y, N104L de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

En otro ejemplo, el receptor de linfocitos T contiene al menos una de las mutaciones en CDR1 α seleccionadas de V29D, S30L y Q31G de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4.

En un ejemplo, el receptor de linfocitos T modificado se genera por selección *in vitro* de una biblioteca de presentación en levadura de receptores de linfocitos T mutantes.

5 En otra realización, el receptor de linfocitos T modificado se expresa como una proteína soluble que se une a su antígeno diana.

En otro ejemplo, los receptores de linfocitos T no mutantes o modificados se expresan en linfocitos T para terapias adoptivas de linfocitos T.

10 Un aspecto de la invención proporciona un agente terapéutico que se dirige a células cancerosas que expresan el antígeno WT1, en el que el agente terapéutico comprende un receptor de linfocitos T modificado del primer aspecto. En una realización, un agente terapéutico que se dirige a las células cancerosas que expresan el antígeno WT1, en el que el agente terapéutico comprende un linfocito T humano que expresa un receptor de linfocitos T modificado del primer aspecto. Una realización proporciona un agente terapéutico de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa el antígeno WT1. Realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describen a continuación o como se definen en las reivindicaciones dependientes.

20 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos alineadas de diversos receptores de linfocitos T específicos de WT1/HLA-A2 del presente estudio. WT1 P22 representa la secuencia no mutante aislada de un clon de linfocitos T humano que se estimuló por WT1/HLA-A2. Las otras secuencias de TCR se aislaron por métodos de presentación en levadura para mayores niveles de superficie y para mayores afinidades. Los restos de aminoácidos dentro de CDR3 β y CDR1 α que están marcados dentro de rectángulos fueron mutaciones en TCRs aisladas para mayor afinidad por presentación en levadura. Las secuencias mostradas para la cadena V β corresponden a SEQ ID NO: 1, 21, 21, 3 y 3, de arriba a abajo. La secuencia conectora representada es SEQ ID NO: 8. Las secuencias mostradas para la cadena de V α corresponden a SEQ ID NO: 2, 22, 4, 2 y 4, de arriba a abajo.

La Figura 2A es un diagrama tridimensional que muestra una vista lateral del complejo TCR:pepMHC (A6; PDB:1AO7). Se indican las regiones variables (V) y constantes (C) de la cadena α y cadena β . La estructura mostrada no incluye la región C α de TCR. HLA-A2 (α 1, α 2, α 3 y β 2m) se muestra en gris, y el péptido Tax (LLFGYPVYV, SEQ ID NO: 7) se muestra en negro. El TCR de A6 y los TCRs de WT1 examinados en la presente divulgación usan todos el segmento V α 2 (también denominado TRAV12 basándose en la nomenclatura de IMGT).

La Figura 2B es un diagrama tridimensional que muestra la vista de arriba abajo de la huella de TCR (CDR) sobre el péptido-MHC (Tax/HLA-A2). Aunque no se han descrito estructuras cristalinas para TCR de WT1 usado en la presente divulgación, esta orientación de enlace diagonal, con la región V α situada sobre la hélice de MHC de α 2 y el extremo N del péptido, y la región V β situada sobre la hélice de MHC de α 1 y el extremo C del péptido, se ha observado en prácticamente todos los complejos hasta la fecha.

La Figura 3 es un diagrama que muestra un método de manipulación de TCRs monocatenarios para afinidad mejorada contra un péptido:HLA.A2. Se muestra el proceso general usado para manipular TCRs de alta afinidad.

La Figura 4 es un esquema del sistema de presentación en levadura para manipular fragmentos monocatenarios de receptores de linfocitos T (V α -conector V β o V β -conector-V α).

Las Figuras 5A y 5B muestran los histogramas de citometría de flujo de la biblioteca propensa a error de TCRs monocatenarios de WT1 después de clasificar con dos anticuerpos que reconocen epítopes de conformación en V β 3. Se clasificó secuencialmente la biblioteca propensa a error de WT1 con una dilución 1:10 de tanto anticuerpos IgG FITC hVb3.1 de Thermo como IgM FITC hVb3.2 de BC, cabra anti-Ig de ratón AlexaFluor 647 y cabra anti-IgM de ratón-APC, para un total de 3 clasificaciones. Entonces se incubaron alícuotas de células de levadura después de cada clasificación con una dilución 1:10 de Thermo hVb3.1 FITC IgG, cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor 647. El gris indica células de levadura teñidas con anticuerpo secundario solo (Figura 5A). El clon estable WT1 D13, aislado después de la 3^a clasificación, se tiñe con una dilución 1:10 de Thermo hVb3.1 FITC IgG, cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor 647 (Figura 5B).

Las Figuras 6A y 6B muestran los histogramas de citometría de flujo de la biblioteca de CDR1 α de D13 de TCR monocatenarios de WT1 después de clasificar con WT1:HLA.A2. La biblioteca de CDR1 α de WT1 D13 se clasificó secuencialmente con dímero WT1:HLA-A2 100-200 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC, durante un total de cinco clasificaciones. Entonces se incubaron alícuotas de células de levadura después de cada clasificación con dímero WT1:HLA-A2 100 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC. El gris indica células de levadura teñidas con anticuerpo secundario solo (Figura 6A). El clon WT1 D13.1, aislado después de la 5^a clasificación, se tiñe con dímero WT1:HLA-A2 100 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (Figura 6B).

Las Figuras 7A y 7B muestran los histogramas de citometría de flujo de la biblioteca de CDR3 combinada con

TCR monocatenarios de WT1 D13.1 después de clasificar con WT1:HLA.A2. La biblioteca de CDR3 combinada con WT1 D13.1 se clasificó secuencialmente con dímero WT1:HLA-A2 10-100 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con APC, para un total de tres clasificaciones. Entonces se incubaron alícuotas de células de levadura después de cada clasificación con

5 dímero WT1:HLA-A2 100 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC. El gris indica células de levadura teñidas con anticuerpo secundario solo (Figura 7A). El clon de unión mejorado WT1 D13.1.1, aislado después de la 3ª clasificación, se tiñe con dímero WT1:HLA-A2 100 nM (DimerX; obtenido de BD Pharmingen), seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (Figura 7B).

10 Las Figuras 8A-8D muestran las propiedades de unión de un TCR de alta afinidad, WT1 D13.1.1, para dímeros y monómeros WT1:HLA-A2. La Figura 8A muestra los histogramas de citometría de flujo del scTCR de alta afinidad WT1 D13.1.1 teñido con diversas concentraciones de dímero de Ig WT1:HLA-A2, seguido por anticuerpo anti-Ig marcado fluorescente como secundario. La Figura 8B muestra los histogramas de citometría de flujo de scTCR WT1 de alta afinidad D13.1.1 teñido con diversas concentraciones de monómero WT1:HLA-A2 biotinilado, seguido por SA-PE (1:100) secundario. La Figura 8C es un gráfico de líneas que muestran los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de histogramas en la Figura 7A representados frente a la concentración de dímero WT1:HLA-A2. La Figura 8D es un gráfico de líneas que muestra los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de histogramas en la Figura 8B representados frente a la concentración de monómero WT1:HLA-A2.

20 Las Figuras 9A-E muestran la unión de TCR soluble de alta afinidad WT1 D13.1.1 que se expresó en *E. coli*. Las Figuras 9A-D son una serie de histogramas que muestran el análisis de citometría de flujo de células T2 humanas (HLA-A2+) incubadas primero sin péptido (Figura 9A), péptido de control negativo Tax (Figura 9B), péptido de control negativo MART-1 (Figura 9C), o péptido WT1 (Figura 9D), seguido por incubación con el TCR WT1-D13.1.1 marcado con biotina. La Figura 9E es un gráfico que representa la valoración que muestra que TCR de WT1-D13.1.1 tuvo una afinidad mínima (valor K_D) de al menos 260 nM (ya que el lavado de células en citometría de flujo da como resultado una infraestimación de afinidades en este intervalo).

25 Las Figuras 10A y 10B muestran la actividad de TCRs no mutantes P22, D13.1, D13.0.1 y D13.1.1 en linfocitos T de ratón. Se transdujeron linfocitos T CD8 (Figura 10A) y CD4 (Figura 10B) de ratón aislados con TCRs P22, D13.1, D13.0.1 y D13.1.1 (los TCRs modificados no contuvieron las mutaciones D13 "estabilizantes" en la región V β : F48S y D51G). Entonces se incubaron los linfocitos T transducidos con APCs HLA-A2+ y diversas concentraciones del péptido WT1. Tras 24 horas de incubación, se midieron las concentraciones de IFN- γ usando un ELISA convencional.

30 La Figura 11 muestra que el TCR de alta afinidad WT1 D13.1.1 en linfocitos T CD8 no mostró actividad contra un panel de péptidos humanos WT1 estructuralmente similares. Los péptidos WT1 estructuralmente similares se determinaron mediante búsquedas del proteoma humano para péptidos con mutaciones conservativas en cada uno de los 9 restos del péptido WT1 (SEQ ID NO: 6). Entonces se sintetizaron los 10 péptidos que se predijo que se unían a HLA-A2 con la mayor afinidad. Los números de péptido 1-10 corresponden a SEQ ID NO: 25-34, respectivamente. Se aislaron linfocitos T CD8 de ratón y se transdujeron con el TCR D13.1.1 (no contuvieron las mutaciones estabilizantes D13 en la región V β , F48S y D51G) y se incubaron durante 24 horas con péptidos respectivos y APCs HLA-A2+.

35 Las Figuras 12A y 12B son diagramas que ilustran aplicaciones terapéuticas a modo de ejemplo de TCRs específicos de WT1. La Figura 12A representa cinco ejemplos de formatos de TCR para su uso como productos terapéuticos solubles: 1) TCR monocatenarios en cualquiera de una orientación V α -V β u orientación V β -V α (los dominios V mutados de alta afinidad se muestran con un asterisco); 2) TCR monocatenario fusionado en marco con los dominios de la región constante de un anticuerpo; 3) fusión de inmunoglobulinas en marco a cualquiera de la región constante de la cadena ligera o la cadena pesada; 4) TCR monocatenario (o las fusiones de inmunoglobulina mostradas en 2 y 3) directamente acoplado a un fármaco; y 5) TCR monocatenario enlazado en marco con un Fv monocatenario (VL-conector-VH) para generar un agente biespecífico. La Figura 12B representa dos ejemplos de terapias basadas en células que usarían los dominios variables de alta afinidad (V) aislados por presentación en levadura, o los dominios V de TCR no mutantes también se pueden usar para terapias adoptivas de linfocitos T con linfocitos T humanos). Los TCRs se clonan en vectores de células de mamífero, para la expresión por linfocitos T en terapia adoptiva de linfocitos T como: 1) receptores monocatenarios en receptores de antígeno quimérico (CAR) y 2) TCRs α y β de longitud completa.

Breve descripción de las secuencias

55 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de una región V β no mutante de TCR (P22) que se une a WT1/HLA-A2.

60 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de una región V α no mutante de TCR (P22) que se une a WT1/HLA-A2.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de una región V β modificada de TCR (D13.1.1) que se une con alta afinidad a WT1/HLA-A2.

65 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de una región V α modificada de TCR (D13.1.1) que se une con alta afinidad a WT1/HLA-A2.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de un TCR monocatenario (WT1-D13.1.1) que se une con alta

afinidad a WT1/HLA-A2.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos del antígeno WT-1.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos del antígeno Tax.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del conector.

5 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de polinucleótidos del corte y empalme de cebador 4L.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de polinucleótidos del cebador inverso usado para generar la biblioteca de CDR1 α de WT1-D13 PreSOE N.º 1.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de polinucleótidos del cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR1 α de WT1-D13 PreSOE N.º 2.

10 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de polinucleótidos del cebador T7.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de polinucleótidos del cebador inverso usado para generar PreSOE N.º 1 de la biblioteca de CDR3 β 1 de WT1-D13.1

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de polinucleótidos del cebador directo usado para generar PreSOE N.º 2 de la biblioteca de CDR3 β 1 de WT1-D13.1

15 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de polinucleótidos del cebador inverso usado para generar PreSOE N.º 1 de la biblioteca de CDR3 β 2 de WT1-D13.1.

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de polinucleótidos del cebador directo usado para generar PreSOE N.º 2 de la biblioteca de CDR3 β 2 de WT1-D13.1.

20 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de polinucleótidos del cebador inverso usado para generar PreSOE N.º 1 de la biblioteca de CDR3 α 1 de WT1-D13.1

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de polinucleótidos del cebador directo usado para generar PreSOE N.º 2 de la biblioteca de CDR3 α 1 de WT1-D13.1

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de polinucleótidos del cebador inverso usado para generar PreSOE N.º 1 de la biblioteca de CDR3 α 2 de WT1-D13.1

25 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de polinucleótidos del cebador directo usado para generar PreSOE N.º 2 de la biblioteca de CDR3 α 2 de WT1-D13.1.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de una región V β modificada de TCR (D13) que se une con alta afinidad a WT1/HLA-A2.

30 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de una región V α modificada de TCR (D13) que se une con alta afinidad a WT1/HLA-A2.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de un péptido de la gripe A.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de un péptido de la gripe A de variante.

SEQ ID NO: 25-34 son las secuencias de aminoácidos de diez péptidos de variante WT1.

35 Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción está prevista para facilitar el entendimiento de la divulgación, pero no pretende ser limitante.

40 En general, los términos y frases usados en el presente documento tienen sus significados reconocidos en la técnica, que se pueden encontrar como referencia a textos estándar, referencias de revista y contextos conocidos por los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de la divulgación.

45 Como se usa en el presente documento, "asociado" se refiere a una asociación entre dos grupos, que puede ser una asociación covalente o no covalente. Los grupos se pueden asociar usando una cadena de péptido de longitud variable, un grupo químico no de aminoácido, u otros medios, como se conoce en la técnica. Una región de conector puede ser una secuencia de aminoácidos que enlaza operativamente dos dominios funcionales o estructurales de una proteína o péptido.

50 Como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterapéutico" se refiere a cualquier sustancia capaz de reducir o prevenir el crecimiento, proliferación, o diseminación de una célula cancerosa, una población de células cancerosas, tumor, u otro tejido maligno. También está previsto que el término englobe cualquier agente antitumoral o antineoplásico.

55 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" pretende englobar contextos tales como una cantidad farmacéuticamente eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es capaz de lograr un estado beneficioso, resultado beneficioso, actividad funcional en un ensayo de cribado, o mejora de un estado clínico.

60 Como se usa en el presente documento, el término "célula cancerosa" pretende englobar definiciones como se entienden ampliamente en la técnica. En una realización, el término se refiere a una célula anormalmente regulada que puede contribuir a un estado clínico de cáncer en un humano o animal. En una realización, el término se puede referir a una línea de células cultivadas o una célula dentro de o derivada de un cuerpo humano o animal. Una célula cancerosa puede ser de una amplia variedad de tipos de células diferenciadas, tejidos u órganos, como se entiende en la técnica. Los ejemplos particulares de células cancerosas incluyen cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de ovario, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer testicular, cáncer de esófago, y otros

tipos de cancer.

Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" se refiere a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo y preferentemente resultados clínicos. El tratamiento se puede referir a cualquiera de la mejora de síntomas de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, "prevención" o "prevenir" se refiere a un enfoque para prevenir, inhibir, o reducir la probabilidad de, la aparición o reaparición de una enfermedad o afección. También se refiere a prevenir, inhibir, o reducir la probabilidad de, la aparición o reaparición de los síntomas de una enfermedad o afección, y también incluye reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes de la aparición o reaparición de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, "inhibir el crecimiento celular" o "inhibir la proliferación de células" se refiere a reducir o detener la velocidad de crecimiento de las células. Por ejemplo, inhibiendo el crecimiento de células tumorales, puede ralentizarse la tasa de aumento en el tamaño del tumor. En otras realizaciones, el tumor puede permanecer con el mismo tamaño o disminuir en tamaño, es decir, retroceder. En realizaciones particulares, la velocidad de crecimiento celular o proliferación celular se inhibe al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, o al menos 90 %.

Los términos "no mutante" y "wt" se usan indistintamente en el presente documento y se usan en referencia a un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos o un polinucleótido que codifica las regiones variables aisladas de un TCR que existe de forma natural o no modificado, por ejemplo, el clon original o parental de linfocitos T, con especificidad por el antígeno.

En las figuras y tablas que presentan las secuencias de aminoácidos, la no mutante se designa algunas veces "wt". En las secuencias presentadas más adelante encima de la secuencia, un guión indica que el aminoácido es el mismo que el presente en la secuencia wt o superior del alineamiento. Una letra indica que se ha hecho una sustitución en esa posición de la secuencia superior.

Como se usa en el presente documento, los términos receptor de linfocitos T "modificado", de "variante", "mutante", "mutado" y "derivado" se refieren a secuencias de TCR de las regiones variables que tienen una o más mutaciones en comparación con el clon original o no mutante de linfocitos T. Los ejemplos de TCRs modificados incluyen TCRs de mayor afinidad.

Una secuencia codificante es la parte de un gen o ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína, o un ARN funcional tal como un ARNt o ARNr.

Complemento o secuencia complementaria significa una secuencia de nucleótidos que forma un dúplex unido por hidrógeno con otra secuencia de nucleótidos según las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick.

En la dirección 3' se refiere a una posición relativa en ADN o ARN y es la región hacia el extremo 3' de una hebra.

Expresión se refiere a la transcripción de un gen en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARN mensajero (ARNm) y posterior traducción de un ARNm en una proteína.

Dos secuencias de ácidos nucleicos son heterólogas entre sí si las secuencias derivan de organismos separados, tanto si dichos organismos son diferentes especies como si no, en tanto que las secuencias no ocurran naturalmente juntas en la misma disposición en el mismo organismo.

Homología se refiere al punto de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos.

Una secuencia de aminoácidos que es funcionalmente equivalente a una secuencia de TCR específicamente ejemplificada es una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada por sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, mediante adición y/o deleción de aminoácidos, o donde uno o más aminoácidos se ha modificado químicamente, pero que sin embargo retiene la especificidad de unión y actividad de unión de alta afinidad de una célula unida o una proteína TCR soluble de la presente divulgación. Las secuencias de nucleótidos funcionalmente equivalentes son las que codifican polipéptidos que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que una proteína TCR unida a célula o soluble específicamente ejemplificada. En el contexto de la presente divulgación, una proteína TCR soluble carece de las porciones de un TCR nativo unido a célula y es estable en disolución (es decir, generalmente no se agrega en disolución cuando se manipula como se describe en el presente documento y en condiciones normales para soluciones de proteína).

El término "aislado" se refiere a una composición, compuesto, sustancia o molécula alterada por la mano del hombre desde el estado natural. Por ejemplo, una composición o sustancia que ocurre en la naturaleza está aislada si ha sido cambiada o retirada de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, no está aislado un polinucleótido o un

5 polipéptido naturalmente presente en un animal vivo, pero está aislado el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural, como el término se emplea en el presente documento. Una construcción de ácidos nucleicos es una molécula de ácido nucleico que está aislada de un gen que existe de forma natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácido nucleico que se combinan y yuxtaponen de un modo que no existiría de otro modo en la naturaleza.

Molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido lineal mono o bicatenario que contiene cualquier desoxirribonucleótido o ribonucleótidos que se unen por enlaces 3'-5'-fosfodiéster.

10 Dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la naturaleza del enlace no interfiere con la capacidad de las secuencias para afectar sus funciones normales las unas con respecto a las otras. Por ejemplo, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia codificante si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia codificante.

15 Un polipéptido es un polímero lineal de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos.

20 El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN que actúa en cis, generalmente 80-120 pares de bases de largo y situada en la dirección 5' del sitio de iniciación de un gen, al que puede unirse ARN polimerasa e iniciar la correcta transcripción. Se pueden asociar secuencias reguladoras de la transcripción adicionales que proporcionan regulación todo/nada de transcripción y/o que potencian (aumentan) la expresión de la secuencia codificante en la dirección 3'.

25 Una molécula de ácido nucleico recombinante, por ejemplo una molécula de ADN recombinante, es una novedosa secuencia de ácidos nucleicos formada *in vitro* mediante la unión de dos o más moléculas de ADN no homólogas (por ejemplo, un plásmido recombinante que contiene uno o más insertos de ADN foráneo clonado en al menos un sitio de clonación).

30 Los términos "transformación" y "transfección" se refieren a la modificación dirigida del genoma de una célula por la aplicación externa de ADN recombinante purificado de otra célula de diferente genotipo, que conduce a su captación e integración dentro del genoma de la célula del sujeto. En bacterias, el ADN recombinante no se integra normalmente en el cromosoma bacteriano, sino que en su lugar se replica autónomamente como un plásmido. Los términos "transformado" y "transfectado" se usan indistintamente en el presente documento. Por ejemplo, un linfocito T se puede transfectar con una secuencia de ADN que codifica un TCR modificado o de alta afinidad descrito en el presente documento antes del tratamiento adoptivo de linfocitos T.

35 En la dirección 5' significa en el lado 5' de cualquier sitio en ADN o ARN.

40 Un vector es una molécula de ácido nucleico que es capaz de replicarse autónomamente en una célula hospedadora y puede aceptar ADN foráneo. Un vector lleva su propio origen de replicación, uno o más sitios de reconocimiento únicos para endonucleasas de restricción que se pueden usar para la inserción de ADN foráneo, y normalmente marcadores de selección tales como genes que codifican resistencia a antibióticos, y frecuentemente secuencias de reconocimiento (por ejemplo, promotor) para la expresión del ADN insertado. Vectores comunes incluyen vectores plasmídicos y vectores de fago.

45 Un receptor de linfocitos T (TCR) de alta afinidad es un TCR manipulado con unión más fuerte a un ligando diana que el TCR no mutante. Algunos ejemplos de alta afinidad incluyen una constante de unión en equilibrio para un ligando diana de entre aproximadamente 10^{-6} M y 10^{-12} M y todos los valores individuales e intervalos en su interior. Este intervalo engloba afinidades entre las informadas por ser afinidades no mutantes (10^{-4} a 10^{-6} M), y las que han sido aisladas por evolución dirigida (aproximadamente 10^{-12} M).

50 Una citocina es una proteína, péptido o glucoproteína preparada por células que afectan otras células.

Mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos.

55 Se apreciará por aquellos expertos en la materia que, debido a la degeneración del código genético, numerosas secuencias de nucleótidos funcionalmente equivalentes codifican la misma secuencia de aminoácidos.

Receptores de linfocitos T

60 El receptor de linfocitos T (TCR) está compuesto por dos cadenas ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) que se emparejan sobre la superficie del linfocito T para formar un receptor heterodimérico. El TCR $\alpha\beta$ se expresa en la mayoría de los linfocitos T en el cuerpo y se sabe que está implicado en el reconocimiento de antígenos restringidos por MHC. Ahora se ha estudiado minuciosamente la genética molecular, estructura y bioquímica de TCRs $\alpha\beta$. Cada cadena α y β está compuesta por dos dominios: Dominios constantes (C) que anclan la proteína en la membrana celular y que se asocian con subunidades invariables del aparato de señalización de CD3, y dominios variables (V) que confieren reconocimiento del antígeno mediante seis bucles, denominados regiones determinantes de la complementariedad

(CDR). Cada uno de los dominios V tiene tres CDRs. Estas CDRs interactúan con un complejo entre un péptido antigénico unido a una proteína codificada por el complejo mayor de histocompatibilidad (pMHC) (Davis y Bjorkman (1988) *Nature*, 334, 395-402; Davis et al. (1998) *Annu Rev Immunol*, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868 p.).

La genética molecular del TCR ha revelado un proceso de recombinación genética entre múltiples genes que se combinan para formar la región codificante de los dominios V. El proceso es análogo al desarrollo de anticuerpos en el que los genes de la cadena pesada y ligera se reordenan para generar la tremenda diversidad presentada por los anticuerpos derivados de linfocitos B (Tonegawa (1988) *In Vitro Cell Dev Biol*, 24, 253-65). En el caso de linfocitos T, el dominio V de la cadena α se forma por la reordenación de una región V (entre aproximadamente 75 en seres humanos) a un segmento del gen Joining (J) (entre aproximadamente 61 en seres humanos) (Figura 5.8, Janeway, 8ª edición). El dominio V de la cadena β se forma por la reordenación de una región V (entre aproximadamente 52 en seres humanos) a un gen Diversity (D) (entre 2 en seres humanos) a un segmento de gen Joining (J) (entre 13 en seres humanos) (Figura 5.8, (Murphy (2012), xix, 868 p.)). Las intersecciones de las reordenaciones de los genes $V\alpha J\alpha$ y $V\beta D\beta J\beta$ codifican los bucles CDR3 de cada cadena, y contribuyen a la tremenda diversidad del TCR $\alpha\beta$, con un límite teórico de más de 10^{15} TCRs diferentes (Davis y Bjorkman (1988) *Nature*, 334, 395-402), muy por encima de la diversidad alcanzable en un humano debido a que solo existe aproximadamente un total de 1011 linfocitos T (Mason (1998) *Immunol Today*, 19, 395-404). La posible diversidad de CDR1 y CDR2 de cada cadena se representa por el número de genes V, ya que estos bucles son codificados dentro del gen V, y los TCRs no experimentan mutación somática *in vivo*. Aunque la diversidad de los bucles CDR1 y CDR2 está relativamente limitada en comparación con los bucles CDR3, ha habido varios ejemplos mostrados donde ha habido selección para regiones V particulares basándose en el antígeno de péptido y/o producto de MHC.

Los productos de MHC de clase I se unen a péptidos de 8 a 10 aminoácidos de longitud y se expresan en todas las células nucleadas en el cuerpo (revisado por (Rock y Goldberg (1999) *Annu Rev Immunol*, 17, 739-79)). Mientras que toda la energía de unión de una interacción anticuerpo-antígeno se centra en el antígeno extraño, una fracción sustancial de la energía de unión de péptido TCR:MHC se refiere a la molécula auto-MHC (Manning y Kranz (1999) *Immunology Today*, 20, 417-422). En realidad, más estudios recientes han sugerido que se han desarrollado los restos particulares de los bucles CDR1 y/o CDR2 para interactuar con restos particulares en las hélices MHC, proporcionándose así una afinidad basal por MHC, que representa el proceso de restricción de MHC (García et al. (2009) *Nat Immunol*, 10, 143-7; Marrack et al. (2008) *Annu Rev Immunol*, 26, 171-203).

Ha habido interés en usar TCRs que tienen afinidades por un antígeno de péptido-MHC (clase I) por encima del intervalo normal (denominados TCRs de mayor afinidad) con el fin de: 1) conducir la actividad de linfocitos T cooperadores CD4 (que carecen del coreceptor CD8) o 2) desarrollar TCRs solubles que se podrían usar para el direccionamiento directo de una célula, uniendo una molécula "efectora" (por ejemplo, regiones Fc de anticuerpo, un fármaco tóxico, o un anticuerpo scFv tal como un anticuerpo anti-CD3, para formar una proteína biespecífica) (Ashfield y Jakobsen (2006) *IDrugs*, 9, 554-9; Foote y Eisen (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 10679-81; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92; Molloy et al. (2005) *Curr Opin Pharmacol*, 5, 438-43; Richman y Kranz (2007) *Biomol Eng*, 24, 361-73). Este enfoque también podría vencer un problema al que hacen frente algunos pacientes con cáncer, por el cual sus linfocitos T no expresan TCRs con especificidad y afinidad de unión adecuadas por posibles antígenos de tumor (debido en parte a los procesos tímicos y periféricos de tolerancia). Por ejemplo, ahora se han identificado más de 300 antígenos de tumor definidos por linfocitos T restringidos por MHC (cancerimmunity.org/peptide/) (Boon y Old (1997) *Curr Opin Immunol*, 9, 681-3; Cheever et al. (2009) *Clin Cancer Res*, 15, 5323-37). Estos antígenos de tumor incluyen péptidos mutados, antígenos de diferenciación y antígenos expresados en exceso, todos los cuales podrían servir de dianas para terapias. Debido a que la mayoría de los antígenos del cáncer descritos hasta la fecha derivaron de proteínas intracelulares que solo pueden ser dirigidas en la superficie celular en el contexto de una molécula de MHC, los TCRs hacen de candidato ideal para agentes terapéuticos, ya que se han desarrollado para reconocer esta clase de antígeno.

Similarmente, los TCRs pueden detectar péptidos derivados de proteínas virales que se han procesado naturalmente en células infectadas y presentado por una molécula de MHC sobre la superficie celular. Se han identificado muchas dianas de antígenos virales durante los últimos 25 años, que incluyen péptidos derivados de genomas virales en VIH y HTLV (por ejemplo, Addo et al. (2007) *PLoS ONE*, 2, e321; Tsomides et al. (1994) *J Exp Med*, 180, 1283-93; Utz et al. (1996) *J Virol*, 70, 843-51). Sin embargo, pacientes con estas enfermedades pueden carecer de los TCRs óptimos para la unión y destrucción de las células infectadas. Finalmente, es posible que los TCRs se pudieran usar como antagonistas de receptores de dianas autoinmunitarias, o como agentes de administración para inmunosuprimir la respuesta de células inmunitarias, en un proceso que sería altamente específico, evitando así la supresión inmunitaria general (Molloy et al. (2005) *Curr Opin Pharmacol*, 5, 438-43; Stone et al. (2012) *Protein Engineering*)).

Receptores de linfocitos T modificados

Se ha usado evolución dirigida para generar TCRs con mayor afinidad por un pMHC específico. Los tres métodos de presentación diferentes que se han usado son presentación en levadura (Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92), presentación en fagos (Li et al. (2005) *Nat*

Biotechnol, 23, 349-54) y presentación en linfocitos T (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). En los tres enfoques, el proceso implica la manipulación de un TCR que presenta la baja afinidad normal del TCR no mutante, por lo que los mutantes de TCR tenían afinidad elevada por pepMHC específico (es decir, para el antígeno original para el que los linfocitos T fueron específicos). Así, se usó el TCR no mutante como molde para producir bibliotecas mutagenizadas en uno o más de los CDRs, seguido por selección de mutantes con mayor afinidad, por unión al antígeno péptido-MHC relacionado. Se conoce bien en la técnica que dicha evolución dirigida *in vitro* es necesaria para manipular afinidades que son superiores solo algunas veces por encima de la afinidad no mutante.

La presentación en levadura permite expresar la proteína de interés sobre la superficie como una fusión de Aga2 (Boder y Wittrup (1997) Nat. Biotech., 15, 553-557; Boder y Wittrup (2000) Methods Enzymol, 328, 430-44). Este sistema se ha usado satisfactoriamente en la manipulación de TCRs de mayor afinidad, anticuerpos monocatenarios, fibronectina y otras proteínas. En el sistema de presentación en levadura, el TCR se ha presentado como una proteína monocatenaria estabilizada, en formas V β -conector-V α o V α -conector-V β (Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92; Kieke et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 5651-6; Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-16; Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 19033-8), o como un heterodímero bicatenario (Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72; Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-16). Se han manipulado dos TCRs de ratón para mayor afinidad usando este sistema: 2C (restringido por la clase I de MHC) y 3.L2 (restringido por la clase II de MHC) (Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92; Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 19033-8). También se han desarrollado recientemente fragmentos de V α V β monocatenarios de TCR humano (denominados scTv o scTCR) aprovechando la excepcional estabilidad de la región V α humana denominada V α 2, también conocida como TCRA12 por la nomenclatura de IMGT (Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72). En este caso, se usaron los receptores de linfocitos T de alta afinidad manipulados *in vitro* en un formato monocatenario para aislar fragmentos scTv estabilizados humanos (V β -conector-V α), que se podrían expresar como proteínas estables, tanto sobre la superficie de levadura como en forma soluble de *E. coli*. Los TCRs incluyeron dos fragmentos scTv humanos estabilizados, scTv A6 que es específico para un péptido derivado de la proteína Tax del virus linfotrópico de linfocitos T humano y scTv 868 que es específico para un péptido derivado de la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana (péptido: SL977-85). Ambos TCRs se usaron en el gen V α 2 (IMGT: familia TRAV12), pero tuvieron restos de CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β derivados del clon original de linfocitos T del que se aislaron los TCRs. Así, los mutantes de mayor afinidad de estos scTCRs derivaron cada uno de su TCR original (parental) contra sus antígenos péptido-MHC relacionados.

En un segundo sistema, la presentación en fagos, la proteína de interés se fusiona con extremo N de una proteína de la cubierta viral (Scott y Smith (1990) Science, 249, 386-90). Se han manipulado diversos TCRs, que incluyen los denominados A6, 868 y 1G4 (restringidos por la clase I del MHC) para mayor afinidad usando este método (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54; Sami et al. (2007) Protein Eng Des Sel, 20, 397-403; Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med, 14, 1390-5). Se permitió la presentación en fagos de estos TCRs por introducción de un enlace disulfuro no nativo entre los dos dominios C para promover el emparejamiento de las cadenas α y β . Este sistema usa así las proteínas heterodiméricas de longitud completa (V α C α /V β C β) derivadas de los clones originales de linfocitos T para manipular contra su péptido-MHC relacionado.

Un tercer sistema que se ha informado para la manipulación de TCRs es la presentación en células de mamífero (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84; Kessels et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 14578-83). Este sistema usa un vector retroviral para introducir cadenas α y β de TCR en un hibridoma de linfocitos T negativo para TCR. En un estudio (Kessels et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 14578-83), se mostró que el TCR mutante seleccionado se unía a un péptido que era estructuralmente muy similar al péptido relacionado (ASNENMDAM frente a ASNENMETM; SEQ ID NO: 23 y 24, respectivamente). En el otro estudio, se mostró que aumentaba la afinidad del TCR mutante por pepMHC relacionado (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). Se ha mostrado en muchos estudios que dichos TCRs de mayor afinidad también presentan mayores afinidades contra variantes estructuralmente similares del péptido relacionado (por ejemplo, (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62)). En el sistema de presentación de células de mamífero, los TCRs introducidos se expresaron sobre la superficie en su conformación nativa, en complejo con subunidades de CD3, permitiendo un linfocito T completamente funcional (competente para la señalización). Así se manipularon los TCRs heterodiméricos de longitud completa en su hospedador nativo usando este método.

TCRs de alta afinidad que se unen a WT1/HLA-A2

La presente divulgación proporciona un TCR no mutante y diversos TCRs de alta afinidad contra el antígeno del cáncer bien conocido WT1/HLA-A2. En ciertos ejemplos, los TCRs manipulados se pueden usar en forma soluble para administración elegida como diana *in vivo*, o como recombinantemente expresados por linfocitos T en un método o tratamiento de transferencia adoptiva. En un ejemplo particular, se puede preparar una forma V α V β monocatenaria del armazón de TCR (scTCR) y usar con una carga tal como una citocina, toxina, radioisótopo, agente quimioterapéutico o fármaco (similar a conjugados anticuerpo-fármaco) para administrar la molécula efectora a la localización donde se une el TCR (por ejemplo, tumor). El TCR también se puede usar en terapias de células, tales como transferencia adoptiva de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y/o linfocitos citolíticos espontáneos (NK),

para mediar en una respuesta contra células cancerosas que expresan WT1. Los armazones de scTCR proporcionados en el presente documento también se pueden usar para el diagnóstico de, por ejemplo, células malignas o infectadas con virus mediante la identificación de, por ejemplo, antígenos de la superficie celular neoplásicos o asociados a virus por enlace covalente, por ejemplo mediante cadenas laterales de aminoácidos reactivos con amina o reactivos con sulfhidrilo del TCR, a un grupo detectable, tal como un radioisótopo o resto fluorescente.

En un ejemplo, las proteínas de scTCR descritas en el presente documento son presentables sobre la superficie de levadura, fago o células de mamífero y se pueden usar para manipular TCRs con incluso mayor afinidad por el antígeno WT1. En un ejemplo, las proteínas de scTCR descritas en el presente documento se pueden expresar en una célula procarionta, tal como *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Mucor miehei*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, células de insecto (por ejemplo, *Drosophila melanogaster*), células de mamífero que incluyen líneas celulares tales como líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), o especie de planta (por ejemplo, canola, soja, maíz, patata, cebada, centeno, trigo), por ejemplo, u otras fuentes de expresión de proteínas conocidas en la materia y producidas en grandes cantidades. El TCR también se puede usar, por ejemplo y a modo de ejemplo solo, para detectar el péptido/MHC específico sobre la superficie de una célula. En un ejemplo, los genes de scTCR desvelados se pueden enlazar por uso de secuencias de péptidos adecuadas, codificadas dentro de la construcción de ADN, a los genes para la señalización de dominios e introducir en linfocitos T que pueden eliminar las células dirigidas. Estas construcciones se han denominado receptores quiméricos de antígeno (CARs), que ahora se usan ampliamente en el campo, que incluyen el uso de CARs que contienen un scTCR.

En las proteínas de TCR monocatenario V α V β proporcionadas, las cadenas alfa variables y beta variables se conectan usando cualquier conector peptídico adecuado, que incluye los conocidos en la técnica, tales como con enlaces de Fv monocatenario de anticuerpo (Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426; Holliger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 6444-8; Hoogenboom (2005) Nat Biotechnol, 23, 1105-16; Turner et al. (1997) J Immunol Methods, 205, 43-54). En un ejemplo, se proporciona un TCR monocatenario humano soluble que tiene la estructura: V α -L-V β o V β -L-V α , en la que L es un conector péptido que enlaza V β con V α , V β es una región β variable de TCR y V α es una región α variable de TCR.

En un ejemplo, TCR de V β V α se denomina WT1 D13.1.1 donde V β es una región β variable de TCR de grupo 3, y V α 2 es una región α variable de TCR de grupo 2 (Utz, U., et al., 1996) (Aggen, D.A., et al., 2011).

En un ejemplo, el conector péptido contiene más de 5 restos de lisina. En un ejemplo, el conector péptido contiene entre 5 y 30 aminoácidos. En un ejemplo, el conector péptido tiene una secuencia de aminoácidos de GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 8). En un ejemplo, el TCR de scV β V α proporcionado no contiene una región constante. Cuando se usa la terminología TCR de scV β V α en el presente documento, se entiende que TCR de scV β V α también se incluye como se entiende la terminología y se usa en la técnica. Así, las cadenas V β y V α se pueden conectar entre sí en cualquier configuración mediante el conector.

En un aspecto de la divulgación, el TCR de V β V α de la divulgación se une específicamente a un ligando con una constante de unión en equilibrio K_D de entre aproximadamente 10^{-6} M y 10^{-12} M. En un ejemplo de este aspecto de la divulgación, el ligando es un ligando péptido/MHC. En un ejemplo, el TCR de V β V α de la divulgación tiene afinidad potenciada hacia un ligando en comparación con las afinidades de TCRs normales no mutantes.

Grupos biológicamente activos

También se proporcionan proteínas de TCR de V β V α como se describe en el presente documento que incluyen un grupo biológicamente activo. Como se usa en el presente documento, "grupo biológicamente activo" es un grupo que causa un efecto medible o detectable en un sistema biológico. En un ejemplo, el grupo biológicamente activo se selecciona de: un agente antitumoral tal como, pero no se limita a, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores enzimáticos, inhibidores de microtúbulos, intercaladores o reticulantes de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN; una citocina tal como, pero no se limita a, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-12, TNF- α , IFN- γ o LT- α (Schrama et al. (2006) Nat Rev Drug Discov, 5, 147-59; Wong et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 373-83); un grupo antiinflamatorio tal como, pero no se limita a, TGF- β , IL-37, IL-10 (Nold et al. (2010) Nat Immunol, 11, 1014-22; Stone et al. (2012) Protein Engineering, un radioisótopo tal como, pero no se limita a, ^{90}Y o ^{131}I (Reichert y Valge-Archer (2007) Nat Rev Drug Discov, 6, 349-56); una toxina tal como, pero no se limita a, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, o la cadena A de ricina (Pastan et al. (2006) Nat Rev Cancer, 6, 559-65; Schrama et al. (2006) Nat Rev Drug Discov, 5, 147-59); un fármaco, o un anticuerpo tal como un Fv monocatenario.

En un ejemplo de este aspecto de la divulgación, el grupo biológicamente activo es una molécula citotóxica, algunas veces denominada un fármaco (por ejemplo, en el término "conjugado anticuerpo-fármaco"). Como se usa en el presente documento, "citotóxico" significa tóxico para las células. Los ejemplos de moléculas citotóxicas incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, metotrexato, mitomicina, 5-fluorouracilo, duocarmicina, auristatinas, maitansinas, caliqueamicinas y análogos de las moléculas anteriores (Jarvis (2012) Chemical and Engineering News, 90, 12-18;

Litvak-Greenfeld y Benhar (2012) *Adv Drug Deliv Rev*; Ricart y Tolcher (2007) *Nat Clin Pract Oncol*, 4, 245-55). Las moléculas citotóxicas no necesitan provocar la muerte celular completa, sino más bien una inhibición medible o detectable del crecimiento o disminución en la actividad celular.

5 En un ejemplo, un TCR descrito en el presente documento se enlaza a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto es útil, por ejemplo, permitiendo que la forma activa del fármaco se cree en la localización dirigida por el TCR (por ejemplo, en el sitio de un tumor).

10 En un ejemplo, el grupo biológicamente activo se une al TCR monocatenario mediante un conector, que se puede llevar a cabo mediante reacciones químicas convencionales tales como con grupos amina libres o grupos sulfhidrilo del TCR.

15 En otro ejemplo, el TCR se une a un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) para generar un agente biespecífico. Se han usado ahora satisfactoriamente en la clínica los anticuerpos biespecíficos que contienen un scFv contra un antígeno de tumor, y uno contra la molécula CD3 del linfocito T (Bargou et al. (2008) *Science*, 321, 974-7). Además, también se ha informado de un agente biespecífico que contiene un TCR y un scFv contra CD3 (Liddy et al. (2012) *Nat Med*, 18, 980-7).

20 También se proporciona un TCR de V β V α monocatenario como se describe en el presente documento que incluye un grupo detectable. En un ejemplo, el grupo detectable es uno que se puede detectar por métodos espectroscópicos o basados en enzimas. En un ejemplo, el grupo detectable es un grupo fluorescente, tal como, pero no se limita a, fluoresceína, R-ficoeritrina (PE), PE-Cy5, PE-Cy7, Texas red o alofocianina (APC); un grupo radiomarcado tal como, pero no se limita a, 1251, 32P, 99mTc; un grupo absorbente, o una enzima con propiedades que generan productos detectables tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

25 Como se conoce en la técnica, se puede unir un grupo biológicamente activo, grupo detectable u otro grupo unido al TCR usando un conector peptídico flexible o por conjugación química, y se pueden unir covalentemente o no covalentemente al TCR.

30 En el presente documento también se proporciona un TCR humano para su uso en un método de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un TCR modificado enlazado a una molécula terapéuticamente eficaz a un mamífero. En una realización particular, el mamífero es humano. En otra realización, el mamífero es un animal de compañía (por ejemplo, un perro, gato, conejo, roedor, caballo) o un animal de ganado (por ejemplo, una vaca, caballo, cerdo).

35 También se proporciona un TCR monocatenario aislado (scTCR) como se describe en el presente documento, y un método de producción del TCR monocatenario en *E. coli*. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un scTCR como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 También se proporcionan los TCRs de scV α V β descritos en el presente documento que se han enlazado a dominios de señalización que dan un TCR activo sobre la superficie de un linfocito T. En un ejemplo, este scTCR se puede usar en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero, que comprende: clonar el TCR en un vector, introducir el vector en linfocitos T de un paciente y transferir de forma adoptiva los linfocitos T de nuevo en un paciente.

45 Polipéptidos y polinucleótidos de TCR modificados

50 La divulgación contempla un vector de ADN que incluye al menos un segmento de ADN que codifica un receptor de linfocitos T monocatenario (scTCR).

55 Los expertos en la materia, mediante técnicas de mutagénesis convencional, junto con los ensayos descritos en el presente documento, pueden obtener secuencias de TCR alteradas y probarlas para afinidad de unión y/o especificidad particulares. Las técnicas de mutagénesis útiles conocidas en la técnica incluyen, sin limitación, síntesis de genes de novo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis específica de región, mutagénesis de barrido de conectores y mutagénesis dirigida al sitio por PCR (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1999)).

60 En la obtención de secuencias codificantes de TCR modificadas, los expertos habituales en la técnica reconocerán que las proteínas derivadas de TCR se pueden modificar por ciertas sustituciones, adiciones, deleciones y modificaciones post-traduccionales de aminoácidos, sin pérdida o reducción de actividad biológica. En particular, se conoce bien que es poco probable que las sustituciones de aminoácidos conservativas, es decir, sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de tamaño, carga, polaridad y conformación similares, alteren significativamente la función de la proteína. Los 20 aminoácidos estándar que son los constituyentes de las proteínas pueden ser ampliamente clasificados en cuatro grupos de aminoácidos conservativos del siguiente modo: el grupo no polar (hidrófobo) incluye alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina; el grupo polar (sin carga, neutro) incluye asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina y tirosina; el grupo positivamente

cargado (básico) contiene arginina, histidina y lisina; y el grupo negativamente cargado (ácido) contiene ácido aspártico y ácido glutámico. Es poco probable que la sustitución en una proteína de un aminoácido por otro dentro del mismo grupo tenga un efecto adverso sobre la actividad biológica de la proteína.

5 En un ejemplo, un scTCR de la divulgación puede contener mutaciones adicionales en cualquier región o regiones del dominio variable que da como resultado una proteína estabilizada. En un ejemplo, una o más mutaciones adicionales está en una o más de CDR1, CDR2, HV4, CDR3, FR2 y FR3. Las regiones usadas para la mutagénesis se pueden determinar por evolución dirigida, donde estructuras cristalinas o modelos moleculares se usan para generar regiones del TCR que interactúan con el ligando de interés (antígeno, por ejemplo). En otros ejemplos, la
10 región variable puede ser redimensionada, añadiendo o delecionando aminoácidos para manipular una interacción deseada entre el scTCR y el ligando.

Los polipéptidos de la divulgación incluyen TCRs modificados, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos (por ejemplo, scTCR), y receptores de antígeno quimérico (CARs). Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" y "glucoproteína" se usan indistintamente y significan un polímero de aminoácidos no limitado a ninguna longitud particular. El término no excluye modificaciones, tales como miristilación, sulfatación, glucosilación, fosforilación y adición, o deleción de secuencias señal. Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una o más cadenas de aminoácidos, en el que cada cadena comprende aminoácidos covalentemente enlazados por enlaces peptídicos, y en el que dicho polipéptido o proteína puede comprender una pluralidad de cadenas ligadas juntas no covalentemente y/o covalentemente por enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células que existen de forma natural y específicamente no recombinantes, o células genéticamente manipuladas o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen deleciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" engloban específicamente los TCRs modificados, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la presente divulgación, o secuencias que tienen deleciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un TCR modificado, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Así, un "polipéptido" o una "proteína" puede comprender un (denominado "un monómero") o una pluralidad (denominado "un multímero") de cadenas de aminoácidos.

30 El término "proteína aislada" citado en el presente documento significa que una proteína objeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que normalmente se encontraría en la naturaleza, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, u otros materiales con los que se asocia en la naturaleza, (5) no se asocia (por interacción covalente o interacción no covalente) con porciones de una proteína con la que la "proteína aislada" está asociada en la naturaleza, (6) se asocia operativamente (por interacción covalente o interacción no covalente) con un polipéptido con el que no se asocia en la naturaleza, o (7) no ocurre en la naturaleza. Dicha proteína aislada se puede codificar por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, o puede ser de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos ejemplos, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, investigación o de otro modo).

En ejemplos particulares, un TCR modificado objeto puede tener: a) una región variable de cadena alfa de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % o 99 % idéntica, a la región variable de cadena alfa de un TCR modificado descrito en el presente documento; y b) una región variable de cadena beta que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % o 99 % idéntica, a la región variable de cadena beta de un TCR modificado descrito en el presente documento.

50 En ejemplos particulares, el TCR modificado puede comprender: a) una región variable de cadena alfa de TCR que comprende: i. una región CDR1 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR1 de cadena alfa de un TCR seleccionado descrito en el presente documento; ii. una región CDR2 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR2 de cadena alfa del TCR seleccionado; y iii. una región CDR3 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR3 de cadena alfa del TCR seleccionado; y b) una región variable de
55 cadena beta que comprende: i. una región CDR1 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR1 de cadena beta del TCR seleccionado; ii. una región CDR2 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR2 de cadena beta del TCR seleccionado; y iii. una región CDR3 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR3 de cadena beta del TCR seleccionado; en el que el TCR se une específicamente a un antígeno WT1. En un ejemplo adicional, el TCR modificado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, es un TCR modificado de variante en el que la variante comprende una cadena alfa y una cadena beta idéntica al TCR modificado seleccionado, excepto por hasta 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR de las regiones alfa V y beta V. A este respecto, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o en ciertos ejemplos, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 más sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR del TCR modificado de variante seleccionado. Las sustituciones pueden ser en CDRs en las regiones alfa V y/o la beta V (Véase, por
60 ejemplo, Muller, 1998, Structure 6:1153-1167).
65

En un ejemplo, se proporciona un polinucleótido que codifica un TCR modificado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros ejemplos relacionados, el polinucleótido puede ser una variante de un polinucleótido que codifica el TCR modificado. Las variantes de polinucleótidos pueden tener identidad sustancial con una secuencia de polinucleótidos que codifica un TCR modificado descrito en el presente documento. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser un polinucleótido que comprende al menos 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o mayor, identidad de secuencia en comparación con una secuencia de polinucleótidos de referencia tal como una secuencia que codifica un TCR descrito en el presente documento, usando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, análisis BLAST usando parámetros convencionales, como se describe más adelante). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores pueden ser apropiadamente ajustados para determinar identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, similitud de aminoácidos, posicionamiento del marco de lectura y similares.

Normalmente, las variantes de polinucleótidos contendrán una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferentemente de forma que la afinidad de unión del TCR codificado por el polinucleótido de variante no se reduzca sustancialmente con respecto a un TCR codificado por una secuencia de polinucleótidos específicamente expuesta en el presente documento.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinea para máxima correspondencia, como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias normalmente se realizan comparando las secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en la que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se alineen óptimamente las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar usando el programa Megalign en el paquete Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa integra varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626-645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. y Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor 11:105 (1971); Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730 (1983).

Alternativamente, el alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar por el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda de métodos de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se pueden usar, por ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre dos o más polinucleótidos. El software para realizar el análisis de BLAST está públicamente disponible mediante el Centro Nacional para Información Biotecnológica. En un ejemplo ilustrativo, se pueden calcular puntuaciones acumuladas usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos de coincidencia; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre <0). Se para la extensión de los aciertos de palabras en cada dirección cuando: la puntuación de alineamiento acumulado descienda la cantidad X de su máximo valor logrado; la puntuación acumulada tienda a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llegue al extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11 y esperanza (E) de 10, y los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)), (B) de 50, esperanza (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

En ciertos ejemplos, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es

decir, huecos) de 20 por ciento o menos, normalmente 5 a 15 por ciento, o 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que ocurren bases de ácido nucleico idénticas en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Se apreciará por los expertos habituales en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un TCR como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos poseen identidad de secuencia mínima con la secuencia de nucleótidos de la secuencia de polinucleótidos nativa u original que codifica TCR modificados que se unen a, por ejemplo, el mismo antígeno. Sin embargo, se contemplan expresamente por la presente divulgación los polinucleótidos que varían debido a diferencias en uso de codones. En ciertos ejemplos, se contemplan expresamente secuencias que han sido optimizadas en codones para la expresión de mamíferos.

Las técnicas convencionales de clonación, aislamiento, amplificación y purificación de ADN, para las reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación, son las conocidas y comúnmente empleadas por los expertos en la técnica. Se describen varias técnicas convencionales en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Wu (ed.) (1993) *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (ed.) (1979) *Meth. Enzymol.* 68; Wu et al. (eds.) (1983) *Meth. Enzymol.* 100 and 101; Grossman y Moldave (eds.) *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Old y Primrose (1981) *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif y Wensink (1982) *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (ed.) (1985) *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK; Hames y Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; y Setlow y Hollaender (1979) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, New York. Las abreviaturas y nomenclatura, donde se empleen, se consideran convencionales en el campo y comúnmente se usan en revistas profesionales tales como las citadas en el presente documento.

Se puede determinar la homología entre secuencias de nucleótidos por análisis de hibridación de ADN, en el que la estabilidad del híbrido de ADN bicatenario depende del grado de apareamiento de bases que ocurre. Las condiciones de alta temperatura y/o bajo contenido de sal reducen la estabilidad del híbrido, y se puede variar para prevenir la hibridación de secuencias que tienen menos de un grado de homología seleccionado. Por ejemplo, para secuencias con aproximadamente 55 % de contenido de G - C, condiciones de hibridación y de lavado de 40 - 50 °C, 6 X SSC (tampón cloruro sódico/citrato sódico) y 0,1 % de SDS (dodecilsulfato de sodio) indican aproximadamente 60 - 70 % de homología, condiciones de hibridación y de lavado de 50 - 65 °C, 1 X SSC y 0,1 % de SDS indican aproximadamente 82 - 97 % de homología, y condiciones de hibridación y de lavado de 52 °C, 0,1 X SSC y 0,1 % de SDS indican aproximadamente 99 - 100 % de homología. También está disponible un amplio intervalo de programas informáticos para comparar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (y medir el grado de homología), y una lista que proporciona fuentes de tanto software comercialmente disponible como libre se encuentra en Ausubel et al. (1999). Los algoritmos de comparación de secuencias y alineamiento de múltiples secuencias fácilmente disponibles son, respectivamente, los programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) y ClustalW. BLAST está disponible en internet en ncbi.nlm.nih.gov y una versión de ClustalW está disponible en www2.ebi.ac.uk.

Se pueden usar cepas industriales de microorganismos (por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Mucor miehei*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*), insecto (*Drosophila*), mamífero (por ejemplo, líneas celulares de ovario de hámster chino, CHO), o especie de planta (por ejemplo, canola, soja, maíz, patata, cebada, centeno, trigo) como células hospedadoras para la producción recombinante de las proteínas de TCR. En ciertos ejemplos, en la primera etapa en la expresión heteróloga de una proteína TCR de alta afinidad o proteína soluble, se ensambla una construcción de expresión para incluir el TCR o secuencia codificante de TCR soluble y secuencias de control tales como promotores, potenciadores y terminadores. También se pueden incluir otras secuencias, tales como secuencias señal y marcadores de selección. Para lograr la expresión extracelular del TCR, la construcción de expresión puede incluir una secuencia señal secretora. En los ejemplos, la secuencia señal no se incluye en la construcción de expresión si se desea expresión citoplásmica. En los ejemplos, el promotor y la secuencia señal son funcionales en la célula hospedadora y proporcionan la expresión y secreción del TCR o proteína de TCR soluble. Se pueden incluir terminadores transcripcionales para garantizar la eficiente transcripción. También se pueden incluir secuencias secundarias que potencian la expresión o purificación de proteínas en la construcción de expresión.

Se pueden usar diversos promotores (región reguladora de la iniciación de la transcripción) según la divulgación. La selección del promotor apropiado puede ser dependiente del hospedador de expresión propuesto. Se pueden usar promotores de fuentes heterólogas, en tanto que sean funcionales en el hospedador elegido.

La selección de promotores también depende de la eficiencia deseada y el nivel de producción de péptidos o proteínas. Los promotores inducibles tales como *tac* se emplean frecuentemente para aumentar espectacularmente el nivel de expresión de las proteínas en *E. coli*. La expresión en exceso de proteínas puede ser perjudicial para las células hospedadoras. Por consiguiente, se puede limitar el crecimiento de células hospedadoras. El uso de sistemas de promotores inducibles permite que las células hospedadoras se cultiven hasta densidades aceptables antes de la inducción de la expresión génica, facilitando así mayores rendimientos de producto.

Se pueden usar diversas secuencias señal según la divulgación. Se puede usar una secuencia señal que es homóloga a la secuencia codificante de TCR. Alternativamente, también se puede usar una secuencia señal que se ha seleccionado o diseñado para la eficiente secreción y procesamiento en el hospedador de expresión. Por ejemplo, pares secuencia señal/célula hospedadora adecuados incluyen la secuencia señal de *sacB* de *B. subtilis* para la secreción en *B. subtilis*, y el factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* o las secuencias señal de *pho1* de fosfatasa ácida de *P. pastoris* para la secreción de *P. pastoris*. La secuencia señal se puede unir directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de peptidasa señal a la secuencia codificante de proteína, o mediante un puente de nucleótidos corto que consiste en normalmente menos de diez codones, donde el puente garantiza el correcto marco de lectura de la secuencia de TCR en la dirección 3'.

Se han identificado elementos para potenciar la transcripción y traducción para sistemas de expresión de proteínas eucariotas. Por ejemplo, el posicionar el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 1000 pb en cualquier lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles transcripcionales 10 a 400 veces en células vegetales. La construcción de expresión también debe incluir las secuencias de iniciación traduccional apropiadas. La modificación de la construcción de expresión para incluir una secuencia consenso de Kozak para la apropiada iniciación traduccional puede aumentar 10 veces el nivel de traducción.

Se emplea frecuentemente un marcador selectivo, que puede ser parte de la construcción de expresión o separado de ella (por ejemplo, llevado por el vector de expresión), de manera que el marcador se pueda integrar en un sitio diferente del gen de interés. Los ejemplos incluyen marcadores que confieren resistencia a antibióticos (por ejemplo, *bla* confiere resistencia a ampicilina para células hospedadoras de *E. coli*, *npII* confiere resistencia a kanamicina a una amplia variedad de células procariontas y eucariotas) o que permiten que el hospedador crezca sobre medio mínimo (por ejemplo, *HIS4* permite que *P. pastoris* o *His- S. cerevisiae* crezcan en ausencia de histidina). El marcador de selección tiene sus propias regiones reguladoras de la iniciación y terminación transcripcionales y traduccionales para permitir la expresión independiente del marcador. Si se emplea resistencia a antibióticos como un marcador, la concentración del antibiótico para la selección variará dependiendo del antibiótico, que generalmente varía desde 10 hasta 600 μg de antibiótico/ml de medio.

La construcción de expresión se ensambla empleando técnicas de ADN recombinante conocidas (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999). La digestión con enzimas de restricción y la ligación son las etapas básicas empleadas para unir dos fragmentos de ADN. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligación, y esto se puede llevar a cabo llenando los nucleótidos protuberantes, delecionando porciones terminales del (de los) fragmento(s) con nucleasas (por ejemplo, *ExoIII*), mutagénesis dirigida al sitio, o añadiendo nuevos pares de bases por PCR. Se pueden emplear policonectores y adaptadores para facilitar la unión de fragmentos seleccionados. La construcción de expresión normalmente se ensambla en etapas que emplean rondas de restricción, ligación y transformación de *E. coli*. Se conocen en la técnica numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción de la construcción de expresión (λ ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA; pET, Novagen Inc., Madison, WI - citado en Ausubel et al., 1999) y la elección particular no es crítica para la divulgación. La selección del vector de clonación se influirá por el sistema de transferencia de genes seleccionado para la introducción de la construcción de expresión en la célula hospedadora. Al final de cada etapa, la construcción resultante se puede analizar por restricción, secuencia de ADN, hibridación y análisis de PCR.

La construcción de expresión se puede transformar en el hospedador como la construcción de vector de clonación, ya sea lineal o circular, o se puede retirar del vector de clonación y usar como tal o introducir en un vector de administración. El vector de administración facilita la introducción y el mantenimiento de la construcción de expresión en el tipo de célula hospedadora seleccionada. La construcción de expresión se introduce en las células hospedadoras por cualquiera de varios sistemas de transferencia génica conocidos (por ejemplo, competencia natural, transformación químicamente mediada, transformación de protoplastos, electroporación, transformación biolística, transfección, o conjugación) (Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989). El sistema de transferencia génica seleccionado depende de las células hospedadoras y los sistemas de vector usados.

Por ejemplo, la construcción de expresión se puede introducir en células de *S. cerevisiae* por transformación de protoplastos o electroporación. La electroporación de *S. cerevisiae* se realiza fácilmente, y da eficiencias de transformación comparables a la transformación de esferoplastos.

Se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica anticuerpos monoclonales o policlonales, preferentemente monoclonales, que reaccionan específicamente con una proteína de TCR en un sitio distinto del sitio de unión del ligando, y muchos están comercialmente disponibles. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*,

2ª ed., Academic Press, New York; y Ausubel et al. (1999) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Los TCRs en forma unida a célula o solubles que son específicos para un ligando diana particular son útiles, por ejemplo, como sondas de diagnóstico para cribar muestras biológicas (tales como células, muestras de tejido, material de biopsia, líquidos corporales y similares) o para detectar la presencia del ligando diana en una muestra de prueba. Frecuentemente, los TCRs se marcan uniendo, ya sea covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Las marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Además, el TCR se puede acoplar a un ligando para una segunda molécula de unión: por ejemplo, el TCR se puede biotinilar. La detección del TCR unido a una célula o molécula diana se puede entonces efectuar uniendo una estreptavidina detectable (una estreptavidina a la que se une una molécula fluorescente, radiactiva, quimioluminiscente, u otra detectable, o para la que está disponible una enzima para la que existe un sustrato cromofórico). Las patentes de Estados Unidos que describen el uso de dichas marcas y/o compuestos tóxicos que se unen covalentemente al scTCR incluyen, pero no se limitan a, los N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.927.193; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; 4.331.647; 4.348.376; 4.361.544; 4.468.457; 4.444.744; 4.640.561; 4.366.241; RE 35.500; 5.299.253; 5.101.827; 5.059.413.

Se pueden detectar TCRs marcados usando un dispositivo de monitorización o método apropiado para la marca usada. Se pueden usar microscopía de fluorescencia o citometría de flujo activada por fluorescencia donde la marca es un resto fluorescente, y donde la marca es un radionúclido, contador gamma, autorradiografía o recuento de centelleo líquido, por ejemplo, se puede usar con la condición de que el método sea apropiado para la muestra que se analiza y el radionúclido usado. Además, puede haber moléculas de detección secundaria o se pueden emplear partículas donde existe una molécula o partícula detectable que reconoce la porción del TCR que no es parte del sitio de unión para el ligando diana en ausencia de un componente de MHC como se indica en el presente documento. La materia conoce compuestos útiles para el diagnóstico de obtención de imágenes *in situ*; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.101.827; 5.059.413. Los radionúclidos útiles para la terapia y/u obtención de imágenes *in vivo* incluyen ¹¹¹Indio, ⁹⁷Rubidio, ¹²⁵Yodo, ¹³¹Yodo, ¹²³Yodo, ⁶⁷Galio, ⁹⁹Tecnecio. Las toxinas incluyen toxina diftérica, ricina y toxina de semilla de ricino, entre otros, con la condición de que una vez el complejo TCR-toxina se una a la célula, el resto tóxico se internalice de manera que pueda ejercer su efecto citotóxico. Se conoce bien en la técnica la tecnología de inmunotoxinas, y moléculas tóxicas adecuadas incluyen, sin limitación, fármacos quimioterapéuticos tales como vindesina, antifolatos, por ejemplo, metotrexato, cisplatino, mitomicina, antraciclinas tales como daunomicina, daunorubicina o adriamicina, y proteínas citotóxicas tales como proteínas inactivantes del ribosoma (por ejemplo, toxina diftérica, proteína antiviral de hierba carmín, abrina, ricina, exotoxina A de *Pseudomonas* o sus derivados recombinantes. Véanse, generalmente, por ejemplo, Olsnes y Pihl (1982) *Pharmac. Ther.* 25:355-381 y *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Eds. Baldwin and Byers, pp. 159-179, Academic Press, 1985.

Se han desvelado la estructura general de moléculas de TCR y métodos de preparación y uso, que incluyen la unión a un péptido:complejo mayor de histocompatibilidad. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente PCT/US98/04274; PCT/US98/20263; WO99/60120.

Composiciones farmacéuticas y agentes terapéuticos

Los TCRs específicos para un ligando diana particular son útiles en el tratamiento de animales y mamíferos, que incluyen seres humanos que se cree que padecen una enfermedad asociada al antígeno particular, por ejemplo, una enfermedad o trastorno neoplásico, tal como cáncer. Los ejemplos de tipos de cánceres que se pueden tratar según los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, tumor de Wilm, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinomas esofágicos, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, neuroblastoma, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de boca, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de piel, carcinoma de pulmón de células pequeñas y cáncer testicular.

Se pueden preparar productos terapéuticos usando los materiales mostrados en el presente documento. Las cantidades eficaces de los productos terapéuticos son la dosis mínima que produce un efecto medible en un sujeto. Los productos terapéuticos se preparan fácilmente por un experto habitual en la técnica. En un ejemplo, un scTCR de la divulgación se administra directamente a un paciente. En una realización, un scTCR de la divulgación se asocia a PEG o a regiones constantes de inmunoglobulina, como se conoce en la técnica. Esta realización extiende la eliminación en suero. En una realización, el scTCR se enlaza a un agente quimioterapéutico o fármaco para administrar el fármaco a una célula diana tal como una célula cancerosa. En una realización, el scTCR se enlaza a una molécula efectora biológica tal como una citocina (Tayal y Kalra (2008) *Eur J Pharmacol*, 579, 1-12). En una realización, el scTCR se enlaza a una citocina con actividad antitumoral, tal como IL-2, IL-12 o TNF α (Wong et al. (2011) *Protein Eng Des Sel*, 24, 373-83). En una realización, el scTCR se enlaza a una citocina inmunoinhibidora, tal como IL-10 o IL-13 (Stone et al. (2012) *Protein Engineering*). En una realización, el scTCR se enlaza a otra molécula de unión al antígeno para formar un agente biespecífico (Miller et al. (2010) *Protein Eng Des Sel*, 23, 549-57; Thakur y Lum (2010) *Curr Opin Mol Ther*, 12, 340-9). En una realización, la molécula biespecífica comprende un scTCR enlazado a un Fv monocatenario, tal como un anti-CD3 ((Bargou et al. (2008) *Science*, 321, 974-7; Liddy et al.

(2012) Nat Med, 18, 980-7), para reticular linfocitos T y células enfermas. En una realización, el scTCR se enlaza a dominios de señalización de TCR, tales como CD3, para formar un receptor quimérico de antígeno ((Porter et al. (2011) N Engl J Med, 365, 725-33; Sadelain et al. (2009) Curr Opin Immunol, 21, 215-23; Stroncek et al. (2012) J Transl Med, 10, 48). Se conocen en la técnica estos métodos y otros métodos de administración, tales como por vía intravenosa. Las dosificaciones útiles se pueden determinar por un experto habitual en la técnica.

Las composiciones de scTCR se pueden formular por cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Se pueden preparar normalmente como inyectables, especialmente para administración intravenosa, intraperitoneal o sinovial (con la vía determinada por la enfermedad particular) o como formulaciones para administración intranasal o por vía oral, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de inyección u otra administración. La preparación se puede, por tanto, por ejemplo, emulsionar, o encapsular la(s) proteína(s)/péptido(s) en liposomas.

Los principios activos se mezclan frecuentemente con aditivos farmacéuticos opcionales tales como excipientes o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y sus combinaciones. La concentración de scTCR en formulaciones inyectables, de aerosol o nasales está normalmente en el intervalo de 0,05 a 5 mg/ml. Se conoce la selección de las dosificaciones eficaces particulares y se realiza sin excesiva experimentación por un experto habitual en la técnica. Se pueden administrar dosificaciones similares a otras superficies de la mucosa.

Además, si se desea, vacunas que podrían incluir un scTCR pueden contener cantidades menores de aditivos farmacéuticos tales como sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-iso-glutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE); y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias: monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween® 80. También se pueden usar dichas formulaciones adicionales y modos de administración como se conocen en la técnica.

Los scTCRs de la presente divulgación y/o fragmentos de unión que tienen estructura primaria similar (superior a 90 % de identidad) a las regiones variables de TCR y que mantienen la alta afinidad por el ligando diana se pueden formular en vacunas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) que se forman con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácidos fosfóricos; y ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, oxálico, tartárico o maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas, por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina y procaína.

Los scTCRs para uso terapéutico se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad y modo que sean profiláctica y/o terapéuticamente eficaces, según lo que se conoce en la técnica. La cantidad que se administra, que generalmente está en el intervalo de aproximadamente 100 a 20.000 µg de proteína por dosis, más generalmente en el intervalo de aproximadamente 1000 a 10.000 µg de proteína por dosis. Se pueden administrar composiciones similares de formas similares usando scTCRs marcados para su uso en obtención de imágenes, por ejemplo, para detectar células a las que se une un ligando diana. Las cantidades precisas del principio activo requeridas para ser administrado pueden depender del criterio del médico o veterinario y pueden ser peculiares para cada individuo, pero dicha determinación está dentro de la experiencia de dicho médico.

El producto de TCR se puede administrar en una dosis única; programa de dos dosis, por ejemplo, separadas dos a ocho semanas; o un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que un primer ciclo de tratamiento puede incluir 1 a 10 o más dosis separadas, seguido por otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según se requiera para mantener y/o reforzar la respuesta.

Cada formulación o combinación de componentes descrita o ejemplificada se puede usar para poner en práctica la divulgación, a menos que se establezca de otro modo. Los nombres específicos de sustancias pretenden ser a modo de ejemplo, ya que se sabe que un experto habitual en la técnica puede nombrar las mismas sustancias de forma diferente. Cuando un compuesto se describe en el presente documento de forma que no se especifique un isómero o enantiómero particular del compuesto, por ejemplo, en una fórmula o en un nombre químico, esa descripción pretende incluir cada isómero y enantiómero del compuesto descrito individual o en cualquier combinación. Un experto habitual en la técnica apreciará que métodos, ligandos diana, grupos biológicamente activos, materiales de partida y métodos de síntesis distintos de los específicamente ejemplificados se pueden emplear en la práctica de la divulgación sin recurrir a excesiva experimentación. Todos los equivalentes funcionales conocidos en la técnica, de cualquiera de dichos métodos, ligandos diana, grupos biológicamente activos, materiales de partida y métodos de síntesis pretenden estar incluidos en la presente divulgación. Siempre que se facilite un

intervalo en la memoria descriptiva, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo, o un intervalo de composición, pretenden estar incluidos en la divulgación todos los intervalos intermedios y subintervalos, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos dados.

5 La formulación exacta, vía de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la condición del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et. al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Ch. 1 p. 1).

10 Se debe observar que el médico adjunto sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, o a disfunciones del órgano. En cambio, el médico adjunto también sabría cómo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no fuera adecuada (descartando toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en la gestión del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar y con la vía de administración. La gravedad de la afección se puede evaluar, por ejemplo, en parte, por métodos de evaluación pronóstica estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variarán según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. También se puede usar un programa comparable al tratado anteriormente en veterinaria.

20 Dependiendo de las afecciones específicas que están tratándose y el método de direccionamiento seleccionado, dichos agentes se pueden formular y administrar por vía sistémica o por vía local. Las técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en Alfonso y Gennaro (1995). Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa o intestinal; administración parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas o intramedulares, así como inyecciones intratecales, intravenosas o intraperitoneales.

25 Para inyección, los agentes de la divulgación se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados a la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

30 Está dentro del alcance de la divulgación el uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos desvelados en el presente documento para la práctica de la divulgación en dosificaciones adecuadas para administración sistémica. Con la elección apropiada del vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente divulgación, en particular las formuladas como soluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como por inyección intravenosa. Los compuestos apropiados se pueden formular fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración por vía oral. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la divulgación se formen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que se va a tratar.

40 Los agentes previstos para ser administrados intracelularmente se pueden administrar usando técnicas bien conocidas por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, dichos agentes se pueden encapsular en liposomas, y luego administrar como se ha descrito anteriormente. Los liposomas son bicapas esféricas de lípidos con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación de liposomas se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales son tanto protegidos del microentorno externo como, debido a que los liposomas se fusionan con membranas celulares, se administran eficientemente en el citoplasma celular. Además, debido a su hidrofobia, las moléculas orgánicas pequeñas pueden ser directamente administradas intracelularmente.

50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente divulgación incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. La determinación de las cantidades eficaces está perfectamente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

55 Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas o soluciones, que incluyen las formuladas para liberación retardada o solo para ser liberadas cuando el fármaco llega al intestino delgado o grueso.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden fabricar de un modo que es en sí conocido, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulado, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, levitación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

65 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como

suspensiones aceitosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Se pueden obtener preparaciones farmacéuticas para uso oral combinando los compuestos activos con excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Se proporcionan núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir tintas o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores.

Métodos de tratamiento

Se pueden usar los TCRs de alta afinidad y composiciones farmacéuticas que comprenden un TCR de alta afinidad, por ejemplo, para tratar un paciente que tiene un cáncer, tumor, tumor maligno o enfermedad neoplásica o trastorno. En un ejemplo, un método de tratamiento de un paciente que tiene cáncer comprende administrar un TCR de alta afinidad descrito en el presente documento. En un ejemplo, el TCR de alta afinidad es específico para WT1. En un ejemplo, el TCR comprende una V β que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En otro ejemplo, el TCR comprende una V α que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En un ejemplo, el TCR de alta afinidad es un TCR monocatenario que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. En otro ejemplo, el TCR de alta afinidad se administra en combinación con un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. En otro ejemplo más, el TCR de alta afinidad se conjuga con un grupo biológicamente activo.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para la transferencia adoptiva de linfocitos T a un paciente en necesidad de la misma, que comprende administrar linfocitos T que expresan ya sea el TCR no mutante o un TCR de alta afinidad descrito en el presente documento. En un ejemplo, los linfocitos T se han transfectado con un polinucleótido que codifica un TCR que es específico para WT1. En un ejemplo, el TCR comprende una V β que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En otro ejemplo, el TCR comprende una V α que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En un ejemplo, el TCR de alta afinidad es un TCR monocatenario que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen además ejemplos no limitantes de la divulgación.

Ejemplo 1

Manipulación de TCRs para mayor afinidad por antígenos de péptido/HLA-A2

La estrategia general usada para descubrir, o generar, TCRs monocatenarios para afinidad y estabilidad mejoradas se muestra en la Figura 3. El proceso implica seis etapas, como se ilustra:

- 1) Clonación de los genes de TCR V α y V β de un clon de linfocitos T tal como P22 (secuencia mostrada en la Figura 1, y la V β que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y la V α que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2) como un formato de TCR monocatenario para presentación. Las regiones V reconocen el péptido antigénico restringido por HLA-A2 WT1

(SEQ ID NO: 6) en complejo con HLA-A2. En la presente divulgación, los genes de la región V de TCR del clon P22 (por ejemplo, Dossett et al. (2009) Mol Ther. 17(4), 742) se clonaron como un formato monocatenario ($V\beta$ -conector- $V\alpha$) y se introdujeron en un vector de presentación en levadura para la expresión sobre la superficie de levadura (Figura 4).

2) Generación de una biblioteca propensa a error y FACs o selección de perlas magnéticas para variantes estabilizadas con un anticuerpo anti- $V\beta$. Debido a que los TCRs monocatenarios de $V\alpha$ y $V\beta$ son frecuentemente inestables debido a la pérdida de las regiones constantes estabilizantes, se generan bibliotecas de mutagénesis propensa a error para seleccionar mutaciones estabilizantes que permiten la expresión estable sobre la superficie de levadura, aunque se pueden usar otros formatos de presentación que incluyen, pero no se limitan a, presentación en fago y mamífero. Los vectores de presentación en fagos y la clonación han dado tamaños de biblioteca de 10^{11} , mientras que los vectores de presentación en levadura y las etapas de recombinación homóloga han dado tamaños de biblioteca de 10^{10} (Benatuil et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 155-9). Se han usado diversos métodos para la selección de variantes, que incluyen unión basada en afinidad a ligandos inmovilizados (presentación en fagos) o selecciones de partículas magnéticas con antígenos (presentación en levadura), o citometría de flujo activada por fluorescencia con antígenos de péptido marcado-MHC (presentación en levadura). Se usan utilización de anticuerpos contra el TCR $V\beta$ que reconocen epítopes plegados, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) o selección de perlas magnéticas para aislar variantes con unión mejorada a anticuerpos en el presente ejemplo.

3) Los clones de scTCR aislados de la selección de la biblioteca propensa a error se evalúan para estabilidad térmica y se elige una variante estabilizada para un molde para maduración por afinidad, y se secuencian. Normalmente, se identifican mutaciones de un solo sitio que contribuyen a elevados niveles superficiales sobre levadura, y mayor estabilidad en solución.

4) Las secuencias de scTCR estabilizadas se usan como molde para la generación de bibliotecas de CDR, normalmente en CDR1 α , CDR3 α , CDR3 β , aunque también se pueden usar otras regiones que incluyen, pero no se limitan a, CDR1 β , CDR2 α , CDR2 β y HV4. En la presente divulgación, se seleccionan variantes presentadas en levadura para unión mejorada a péptido:MHC, de las bibliotecas de CDR, usando selecciones de perlas magnéticas y/o citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), aunque se pueden usar las selecciones que utilizan otros métodos que incluyen, pero no se limitan a, inmunopurificación con presentación en fagos o selecciones magnéticas o FACS con presentación en mamífero.

5) Los clones de scTCR aislados de la selección de las bibliotecas de CDR se evalúan para unión específica al péptido:MHC contra el que se manipularon. Los plásmidos se rescatan de los clones de levadura, y se secuencian.

6) Si se requieren mejoras adicionales de afinidad, se puede usar el clon de scTCR seleccionado en la etapa 5 como molde para la generación de bibliotecas adicionales en otros bucles o regiones que no seleccionaron mutaciones tales como CDR1 α , CDR3 α , CDR3 β , aunque también se pueden usar otras regiones que incluyen, pero no se limitan a, CDR1 β , CDR2 α , CDR2 β y HV4. Ejemplos de cada una de estas etapas se describen adicionalmente a continuación.

Ejemplo 2

Análisis de TCR humano A6, que usa $V\alpha 2$, en complejo con TAX:HLA.A2

Todos los TCRs adoptan un pliegue de Ig y ángulo de enlace similares, y el reconocimiento por TCR de pepMHC está completamente mediado por restos específicos en bucles de CDR (Garcia et al. (2009) Nat Immunol, 10, 143-7; Marrack et al. (2008) Annu Rev Immunol, 26, 171-203; Rudolph et al. (2006) Annu Rev Immunol, 24, 419-66)). Aunque las estructuras cristalinas para los TCRs WT1 no están disponibles en el momento de la presente divulgación, se muestra la estructura del complejo A6:péptido Tax:HLA-A2 (PDB: 1A07) (Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141), que usó el mismo dominio $V\alpha 2$ de TCR WT1 P22. La vista lateral del complejo mostró que los extremos de los dominios variables que contuvieron las seis CDRs acopladas sobre la molécula de Tax:HLA.A2, con la región central del sitio de unión situada sobre el péptido Tax (Figura 2A). La estructura cristalina no incluye la región constante α , aunque las regiones constantes ayudan a estabilizar la construcción de longitud completa. Las mutaciones estabilizantes seleccionadas en la etapa 2 descrita anteriormente se seleccionan frecuentemente en regiones estructurales, tales como la interfase $V\alpha/V\beta$ o donde las intersecciones de la interfase $C\alpha/V\alpha$ o $C\beta/V\beta$ ocurren en TCR de longitud completa.

Se muestra la vista arriba abajo del complejo Tax:HLA-A2, con el TCR "quitado", excepto por los seis bucles CDR (Figura 2B). Esta vista muestra que el TCR adopta una posición diagonal con respecto al péptido-MHC, un hallazgo que se ha observado ahora para todas las estructuras de TCR:péptido-MHC. En esta orientación, los dos bucles CDR3 están situados sobre el péptido, aunque existen diversos restos de los bucles CDR1 y CDR2 que interaccionan predominantemente con las hélices de la molécula de MHC. Para los fines de maduración por afinidad en las etapas 4 y 6, estos bucles son frecuentemente los elegidos como diana para la generación de bibliotecas de maduración por afinidad, aunque se pueden usar otras regiones.

Ejemplo 3

Presentación en levadura de TCRs WT1

Para realizar selecciones para estabilidad mejorada (etapa 2) o afinidad mejorada (etapa 5), es necesario usar un sistema de presentación en el que una biblioteca de mutantes de TCR se pueda cribar para unirse a un anticuerpo que reconoce un epítipo de conformación o un ligando de péptido:MHC, respectivamente. Se han usado tres sistemas de presentación para manipular TCRs para mayor afinidad, y se podrían usar para este proceso: presentación en levadura, presentación en fagos y presentación en linfocitos T (célula de mamífero). También pueden ser adecuados para este proceso métodos de presentación alternativos, tales como presentación en ribosoma, ARN, ADN y CIS. En todos estos casos, se clonó en el sistema el TCR no mutante con baja afinidad por el antígeno, y se usó como molde para manipular TCRs con estabilidad y afinidad potenciadas contra el ligando péptido:MHC. Cualquiera de estos sistemas se podría aplicar al enfoque descrito aquí, en el que un único TCR se usa como molde para bibliotecas y la selección de TCRs con propiedades de unión potenciadas.

En el presente ejemplo, se usó presentación en levadura como plataforma (Figura 4). Se usó TCR WT1 como molde para estabilizar mutaciones mediante mutagénesis propensa a error, y se usaron clones estabilizados de las selecciones como moldes para maduración por afinidad.

Ejemplo 4

Construcción de bibliotecas propensas a error y selección de un TCR WT1 estabilizado, WT1-D13

Se generó la biblioteca propensa a error de WT1 como se describe previamente (Richman et al. (2009) Methods Mol Biol 504, 323-350) utilizando la línea celular reactiva con WT1 denominada P22 como molde. Así se introdujo la biblioteca de scTCR propensa a error de WT1 humano en el vector de presentación en levadura combinando el vector linealizado pCT302, producto de PCR propenso a error WT1 y células de levadura competentes EBY100. La biblioteca resultante contuvo aproximadamente $2,3 \times 10^7$ clones independientes, se determinó por siembra de alícuotas de dilución limitante de levadura después de la electroporación. La biblioteca se seleccionó para unirse a dos anticuerpos que reconocen hVβ3 humano, IgG FITC anti-hVβ3.1 (Thermo Scientific) e IgM FITC anti-hVβ3 (Beckman Coulter), mediante FACS según la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de clasificación

Clasificación	Condiciones
1	FITC hVβ3.1 de Thermo Scientific (1:10); anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor® 647 (1:100) Y IgM FITC hVβ3 de Beckman Coulter (1:10); APC de cabra anti-IgM de ratón (1:4)
2	FITC hVβ3.1 de Thermo Scientific (1:10); anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor® 647 (1:100) Y IgM FITC hVβ3 de Beckman Coulter (1:10); APC de cabra anti-IgM de ratón (1:4)
3	FITC hVβ3.1 de Thermo Scientific (1:10); anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor® 647 (1:100) Y IgM FITC hVβ3 de Beckman Coulter (1:10); APC de cabra anti-IgM de ratón (1:4)

Usando estudios de desnaturalización térmica, los presentes inventores han identificado que estos anticuerpos reconocen epítopes plegados en Vβ3 (datos no mostrados). Se amplificaron las señales usando anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón AlexaFluor® 647 (Life Technologies) y APC de cabra anti-IgM de ratón (Invitrogen). Durante 3 clasificaciones iterativas, apareció una población de tinción positiva para Vβ3 (Figura 5A). Tras la 3ª clasificación, se aisló un clon denominado WT1-D13 para fluorescencia de Vβ3 mejorada (Figura 5B) y mostró estabilidad térmica cuando se calentó hasta 80 °C (datos no mostrados). El clon WT1-D13 se usó como molde para maduración por afinidad.

Ejemplo 5

Construcción de bibliotecas de CDR1α y selección de un TCR de WT1 con unión potenciada a WT1:HLA.A2, WT1.1

Se usó el clon estabilizado de WT1-D13 de la selección de bibliotecas de PCR propensas a error como molde para la generación de una biblioteca de CDR1α que abarcaba 4 restos adyacentes mediante corte y empalme por extensión por solapamiento (SOE) (Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535). La biblioteca de scTCR de CDR1α WT1-D13 humano se introdujo así en el vector de presentación en levadura combinando el vector linealizado pCT302, producto de PCR de la biblioteca de CDR1α de WT1-D13 y células de levadura competentes EBY100. La biblioteca resultante contuvo aproximadamente $3,1 \times 10^6$ clones independientes, se determinó por siembra de alícuotas de dilución limitante de levadura después de la electroporación. La biblioteca de CDR1α de WT1-D13 se clasificó por FACS según la Tabla 2 para unirse a dímeros WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 6)/HLA.A2/Ig (BD DimerX).

Table 2. Condiciones de clasificación

Clasificación	Condiciones
1	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
2	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
3	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
4	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
5	Dímero WT1:HLA.A2 200 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)

Después de cinco rondas de selección por FACS con dímeros WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 6)/HLA-A2/Ig, empezó a aparecer una población de tinción moderadamente positiva (Figura 6A). El clon WT1-D13.1, aislado siguiendo la 5ª clasificación, mostró una modesta mejora de la unión a WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 6)/HLA.A2 y se usó como molde para la maduración por afinidad adicional (Figura 6B).

Ejemplo 6

Construcción de la biblioteca de CDR3 y selección de un TCR de WT1 con unión adicionalmente potenciada a WT1:HLA.A2, WT1.1.1

Para mejorar además la afinidad de scTCR de WT1, se generaron bibliotecas de CDR3 usando el clon WT1-D13.1 aislado de la biblioteca de CDR1 α de WT1-D13 como molde. Se generaron bibliotecas de CDR3 de WT1-D13.1 por corte y empalme por PCR de extensión con solapamiento (SOE), preparando codones degenerados que abarcaban 5 codones adyacentes en cada CDR3 cada vez (2 bibliotecas en el bucle de CDR3 β ; 2 en el bucle de CDR3 α). Así se introdujo cada biblioteca de CDR3 de WT1-D13.1 en el vector de presentación en levadura combinando el vector linealizado pCT302, producto de PCR de CDR3 de WT1-D13.1 (es decir, biblioteca de CDR3 α 1, CDR3 α 2, CDR3 β 1 o CDR3 β 2) y células de levadura competentes EBY100. Se reunieron las cuatro bibliotecas resultantes y la biblioteca combinada resultante contuvo aproximadamente 3,5 X 10⁶ clones independientes como se ha determinado por siembra de alícuotas de dilución limitante de levadura después de electroporación. Las bibliotecas combinadas de CDR3 de WT1-D13 se clasificaron por FACS según el diagrama en la Tabla 3 para unirse a dímeros WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 6)/HLA.A2/Ig (BD DimerX).

Tabla 3. Condiciones de clasificación

Clasificación	Condiciones
1	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
2	Dímero WT1:HLA.A2 100 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)
3	Dímero WT1:HLA.A2 10 nM Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con APC (1:100)

Después de tres rondas de selección por FACS con dímeros WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 8)/HLA-A2/Ig, empezó a aparecer una población de tinción positiva (Figura 7A). El clon WT1-D13.1.1, aislado siguiendo la 3ª clasificación, mostró unión elevada a WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 8)/HLA.A2 (Figura 7B).

Ejemplo 7

Análisis de unión de TCR de WT1 de alta afinidad, WT1-D13.1.1

Para evaluar la unión del clon WT1-D13.1.1 aislado de selecciones de bibliotecas de CDR3, se valoró levadura que presentaba WT1-D13.1.1 con dímeros WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 6)/HLA.A2 HLA-A2-Ig) y los monómeros se expresaron y purificaron de *E. coli*. Los dímeros WT-1/A2 se ensayaron a 160 pM a 500 nM (Figura 8A), y los monómeros se ensayaron a 6,4 nM a 4 μ M (Figura 8B). Entonces se lavaron las células de levadura y se analizaron por citometría de flujo. Se representaron la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada histograma frente a la concentración del complejo WT-1/HLA-A2. Se normalizaron los valores usando análisis de regresión no lineal y se determinaron valores de K_{D,ap} de 25 nM y 240 nM para dímero y monómero, respectivamente (Figura 8C y 8D). Así, WT1-D13.1.1 presentó afinidad nanomolar.

Ejemplo 8

Análisis de unión de TCR de WT1 de alta afinidad soluble, WT1-D13.1.1

5 Para mostrar adicionalmente que WT1-D13.1.1 scTv se unió específicamente a WT1/HLA-A2 con alta afinidad, se expresó una forma soluble de WT1-D13.1.1 scTv y se replegó a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* y se biotiniló mediante un marca BirA del extremo C (Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72; Zhang et al. (2007) J Exp Med, 204, 49-55). Se incubó la línea celular humana T2 (HLA-A2+) con Tax 1 μ M, MART-1, o péptidos WT1, y se lavó. Se valoró WT1-D13.1.1 scTv biotinilado sobre células T2 precargadas sin péptido (Figura 9A), o con el péptido negativo Tax (4 nM a 1 μ M) (Figura 9B), péptido nulo MART-1 (4 nM a 1 μ M) (Figura 9C), WT1 (4 nM a 1 μ M) (Figura 9D). Las células se lavaron y se incubaron con SA-PE y se analizaron por citometría de flujo. Solo células cargadas con péptido WT1 se unieron por TCR de WT1-D13.1.1 (Figura 9A-D) que muestra que el TCR soluble era específico para WT1. La regresión no lineal del gráfico de IMF frente a concentración de TCR de la valoración de WT1 mostró que TCR soluble presentó un valor de K_D mínimo de 260 nM (Figura 9E).

Ejemplo 9

Análisis de secuencias de los TCR aislados para afinidad mejorada contra el antígeno WT1

20 Se determinaron secuencias de los TCRs monocatenarios específicos de WT1 (P22, D13, D13.1, D13.0.1 y D13.1.1) de plásmido aislados, y se muestran en la Figura 1. Las secuencias de aminoácidos de la cadena V β de P22, D13, D13.1, D13.0.1 y D13.1.1 se exponen en SEQ ID NO: 1, 21, 21, 3 y 3, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de la cadena V α de P22, D13, D13.1, D13.0.1 y D13.1.1 se exponen en SEQ ID NO: 2, 22, 4, 2 y 4, respectivamente. Obsérvese que D13.0.1 se construyó retirando las mutaciones de CDR1 α del scTCR madurado por afinidad final D13.1.1 (SEQ ID NO: 5). Las posiciones de aminoácidos subrayadas en la Figura 1 indican mutaciones que surgieron de selecciones de bibliotecas propensas a error para mutaciones estabilizantes. Las posiciones de aminoácidos en recuadros muestran las mutaciones de potenciamiento de afinidad que se seleccionaron de bibliotecas de CDR.

30 Ejemplo 10

Actividad *in vitro* de TCRs WT1-P22, WT1-D13.1, WT1-D13.0.1 y WT1-D13.1.1 en linfocitos T CD8 y CD4

35 Para evaluar la actividad de los diferentes TCRs específicos de WT1 en linfocitos T, se aislaron linfocitos T CD8 (Figura 10A) y CD4 (Figura 10B) de ratones transgénicos AAD (estos son ratones que tiene un gen de clase I híbrido que consiste en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HLA-A2 y el dominio $\alpha 3$ del ratón D^b; estos ratones AAD están disponibles de Jackson Laboratories). Las células se activaron con perlas acopladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y luego se transdujeron con los TCRs WT1-P22, WT1-D13.1, WT1-D13.0.1 y WT1-D13.1.1 (las secuencias no contuvieron las mutaciones estabilizantes D13, V β F48S y D51G), como se describe en Chervin et al, (2013) Gene Ther. 20(6):634-44. Los linfocitos T se incubaron con diferentes concentraciones del péptido WT1 y los blastocitos AAD se prepararon por estimulaciones con concanavilina A de células esplénicas de ratones AAD. Después de una incubación de 24 horas, se analizaron los sobrenadantes para la concentración de IFN- γ usando un ELISA. Los linfocitos T CD8 mostraron la mayor actividad con los TCRs D13.0.1 y D13.1.1 (Figura 10A). Los linfocitos T CD4 solo se activaron con el TCR D13.1.1, que muestran que D13.1.1 puede mediar en la actividad independientemente de CD8 (Figura 10B). No se ha observado reactividad con otros péptidos de unión a HLA-A2 tales como MART1.

Ejemplo 11

50 TCR WT1-D13.1.1 en linfocitos T CD8 no son reactivos con péptidos humanos que son estructuralmente similares a WT1

Para determinar además la especificidad de TCR de alta afinidad WT1-D13.1.1, se evaluó la actividad *in vitro* con péptidos estructuralmente similares al péptido WT1. Se realizó una búsqueda de proteoma para péptidos estructuralmente similares al péptido WT1, basándose en mutaciones conservativas en los 9 restos de WT1. Entonces se accedió a los péptidos presentes en el proteoma humano para la capacidad para unirse a HLA-A2 mediante algoritmos de predicción. Se sintetizaron los diez péptidos que se predijo que se unían a HLA-A2 con la mayor afinidad (Figura 11) y se probaron para la capacidad para activar linfocitos T CD8 transducidos con el TCR WT1-D13.1.1 de alta afinidad. Ninguno de estos péptidos presentó actividad, sugiriendo que este TCR mantiene la especificidad cuando se presenta con estos 10 péptidos estructuralmente similares.

Ejemplo 12

65 Formatos terapéuticos de TCR WT1, WT1-D13.1 y WT1-D13.1.1

Se conoce bien que los TCRs de mayor afinidad se pueden usar en diversos formatos para direccionar células que

expresan el antígeno correspondiente. Así, es evidente que se pueden usar los TCRs generados a partir de las estrategias de manipulación mostradas anteriormente ya sea en forma soluble o en terapia génica de TCR para terapias adoptivas de linfocitos T, como se ilustra en la Figura 12.

5 Materiales y métodos

Anticuerpos, péptido:HLA-A2, MACS y reactivos de citometría de flujo

10 Los anticuerpos usados para detectar la expresión superficial en levadura incluyeron: marca de epítipo anti-HA (clon HA.11; Covance), anticuerpo FITC anti-hVβ3 (clon CH92; Beckman-Coulter), FITC anticuerpo anti-hVβ3.1 (clon 8F10; Thermo Scientific), anticuerpo anti-hVβ20 (clon ELL1,4; Beckman-Coulter), anticuerpo monoclonal anti-Vα2 generado en el laboratorio de los presentes inventores (datos no mostrados), APC de cabra anti-IgM de ratón (Life Technologies), anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón F(ab')₂ AlexaFluor® 647 (Invitrogen), estreptavidina-ficoeritrina (SA:PE, BD Pharmingen) y microperlas MACS (Miltenyi Biotec).

15 Se sintetizaron péptidos que se unen a HLA-A2 [WT1₁₂₆₋₁₃₄: RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 6) por química convencional de F-moc (N-(9-fluorenil)metoxicarbonilo) en la Instalación Central Macromolecular en el Colegio de Medicina de la Universidad del Estado de Pensilvania (Hershey, PA, EE.UU.). Para FACS y análisis de citometría de flujo, se usó la proteína de fusión HLA-A2:Ig dimérica soluble recombinante (BD™ DimerX). Además, se utilizó un reactivo monomérico de HLA.A2-biotina generado por el intercambio de un péptido escindible por UV por otro péptido restringido por HLA.A2 en presencia de luz UV para citometría de flujo y selecciones de MACS (Rodenko et al. (2006) Nat Protoc, 1, 1120-1132; Toebes et al. (2006) Nat Med, 12, 246-251).

Clonación y expresión de scTv en vectores de presentación en levadura

25 Se expresaron fragmentos de la región variable de TCR (scTv) en plásmido de presentación en levadura pCT302 (Vβ-L-Vα) (Boder y Wittrup (2000) Methods Enzymol, 328, 430-444), que contenían una fusión de AGA2 inducible por galactosa que permitía el crecimiento en medio Trp. La inducción del gen scTv implica el crecimiento de las células de levadura EBY100 transformadas hasta fase estacionaria en medio de selección, seguido por transferencia a medio que contenía galactosa. Se sintetizó el gen TCR monocatenario de WT1 de molde por Genscript (Piscataway, NJ, EE.UU.) con una mutación F49S en el dominio Vα2 de la construcción (Aggen et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 361-372).

35 Se aislaron los genes de TCR específicos de WT1 de clones de CTL (genes de TCR contra WT1 de Phillip Greenberg; por ejemplo, Dossett et al. (2009) Mol Ther. 17(4), 742) y los genes se sintetizaron por Genscript, se clonaron como un formato monocatenario (Vβ-conector-Vα), se introdujeron en un vector de presentación en levadura para la expresión sobre la superficie de levadura. Los scTvs consistieron en los contenidos variables unidos por la región de conector GSADDAKKDAKKDGGK (SEQ ID NO: 8) (Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA, 89, 4759-4763; Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA, 102, 19033-19038; Aggen et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 361-372). El scTv se introdujo en los sitios de restricción NheI y XhoI de pCT302.

Generación, presentación y selección de bibliotecas de presentación en levadura de scTv mutado

45 Se usó PCR propensa a error para generar mutaciones al azar, como se describe previamente (Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-916). Se generaron las bibliotecas de CDR1 y 3 usando corte y empalme por PCR de extensión con solapamiento (SOE) que abarcaba 4-5 codones adyacentes cada vez (Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535).

50 Para la biblioteca de CDR1α de WT1-D13, se generaron productos de PCR pre-SOE utilizando los siguientes pares de cebadores: 5' - GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TA -3' (corte y empalme 4L) (SEQ ID NO: 9) y 5' - ACG ATC GCT ATA GGT GCA GTT CAA TGA TGC AAT AGC ACC TTC CGG GAC ACT TAA TGG GCC GCT - 3' (SEQ ID NO: 10) y 5' - ATT GCA TCA TTG AAC TGC ACC TAT AGC GAT CGT NNS NNS NNS NNS TTC TTT TGG TAT AGA CAG TAC AGT GGC AAA TCC CCG - 3' (SEQ ID NO: 11) y 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (T7) (SEQ ID NO: 12). Se realizó PCR de SOE con cada Pre-SOE correspondiente, junto con tanto T7 como el corte y empalme 4L.

60 Para las bibliotecas de CDR3 de WT1-D13.1, se generaron productos de PCR pre-SOE para cada una de las cuatro bibliotecas utilizando los siguientes pares de cebadores: β1: 5'-GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TA -3' (corte y empalme 4L) (SEQ ID NO: 9) y 5'-TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT - 3' (SEQ ID NO: 13), y 5' - AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA AGC AGT TCC ATC NNS NNS NNS NNS GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG - 3' (SEQ ID NO: 14) y 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (T7) (SEQ ID NO: 12); β2: corte y empalme 4L (SEQ ID NO: 9) y 5' - TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT - 3' (SEQ ID NO: 15), y 5' - AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA AGC AGT TCC ATC NNS NNS NNS NNS GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG - 3' (SEQ ID NO: 16) y T7 (SEQ ID NO: 12); α1: corte y empalme 4L (SEQ ID NO: 9) y 5' - GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT

TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA - 3' (SEQ ID NO: 17), y 5' - CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GCC NNS NNS NNS NNS NNS AAT ATG CTG ACC TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG - 3' (SEQ ID NO: 18) y T7 (SEQ ID NO: 12); $\alpha 2$: corte y empalme 4L (SEQ ID NO: 9) y 5' - GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA - 3' (SEQ ID NO: 19), y 5' - CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GCC GCG AAT AAC GCG NNS NNS NNS NNS NNS TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG - 3' (SEQ ID NO: 20) y T7 (SEQ ID NO: 12).

Se prepararon bibliotecas de levadura por recombinación homóloga en levadura EBY100 por electroporación de productos de PCR propensa a error o SOE junto con pCT302 digerido con NheI y XhoI (Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535). Las bibliotecas se indujeron en medio que contenía galactosa (SG-CAA) durante 48 h, se lavaron con 1 ml de 1 % de PBS/BSA y se tiñeron con anticuerpos o reactivos de péptido:MHC a las concentraciones indicadas en las Figuras 4A, 5A, 6A, 8A y 9A. Se lavaron las células (1 ml, 1 % de PBS/BSA), y las células más fluorescentes se seleccionaron usando un citómetro de alta velocidad FACS Aria (BD Bioscience) o mediante columnas de MACS LS en un separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec). Para probar la estabilidad térmica de clones aislados, se incubó levadura a temperatura elevada durante 30 min antes del protocolo de tinción (datos no mostrados).

Aislamiento y tinción de clones de alta afinidad

Tras las selecciones, se aislaron clones de bibliotecas por siembra de diluciones limitantes. Se expandieron las colonias y se indujeron en medio que contenía galactosa (SG-CAA) durante 48 horas, se lavaron con 1 ml de 1 % de PBS/BSA y se tiñeron con diversas concentraciones de péptido/HLA.A2 DimerX, anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón F(ab')₂ AlexaFluor® 647, o diversas concentraciones de péptido/HLA.A2 intercambiado por UV, SA-PE. Las células se lavaron (1 ml, 1 % de PBS/BSA) y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6.

Se recuperaron plásmidos usando Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II (Zymo Research) y se introdujeron de nuevo en *E. coli* mediante transformación mediante choque térmico en células competentes Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ (Invitrogen). Se expandieron células de *E. coli* y se aislaron plásmidos usando QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Las secuencias de clones individuales se determinaron por secuenciación de Sanger.

AFIRMACIONES REFERENTES A LAS VARIACIONES

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de habilidad de los expertos en la técnica a la que se refiere la divulgación.

Cuando se usa un grupo de Markush u otra agrupación en el presente documento, todos los miembros individuales del grupo y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles del grupo pretenden estar individualmente incluidas en la divulgación.

Donde se usan los términos "comprende", "comprende", "comprendido" o "que comprende" en el presente documento, se deben interpretar como que especifican la presencia de las características establecidas, números enteros, etapas o componentes citados, pero no para excluir la presencia o adición de una o varias características, números enteros, etapas, componentes, o sus grupos. Realizaciones separadas de la divulgación también pretenden estar englobadas, en las que los términos "que comprende" o "comprende(n)" o "comprendido" se sustituyen opcionalmente con los términos, de gramática análoga, por ejemplo, "que consiste(n)/consiste(n)" o "que consiste(n) esencialmente en/consiste(n) esencialmente en" para así describir realizaciones adicionales que no son necesariamente coextensivas. Para aclaración, como se usa en el presente documento, "que comprende" es sinónimo de "que tiene", "que incluye", "que contiene" o "caracterizados por" y es inclusivo y de extremos abiertos y no excluye elementos no citados adicionales o etapas de método. Como se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, componente, o ingrediente no especificado en el elemento de reivindicación. Como se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación (por ejemplo, que no afectan un principio activo). En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede sustituir con cualquiera de los otros dos términos. La divulgación descrita ilustrativamente en el presente documento se puede poner adecuadamente en práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se desvelan específicamente en el presente documento.

La divulgación se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, se debe entender que se pueden hacer muchas variaciones y modificaciones. Se apreciará por un experto habitual en la técnica que composiciones, métodos, dispositivos, elementos de dispositivos, materiales, características opcionales, procedimientos y técnicas distintos de los específicamente descritos en el presente documento se pueden aplicar a la práctica de la divulgación como se ha desvelado ampliamente en el presente documento sin recurrir a excesiva experimentación. Todos los equivalentes funciones conocidos en la técnica de composiciones, métodos, dispositivos, elementos de dispositivos, materiales, procedimientos y técnicas descritos en el presente documento; y sus porciones; pretenden estar englobados por la presente divulgación. Siempre que se

desvele un intervalo, pretenden estar englobados todos los subintervalos y valores individuales. La presente divulgación no se debe limitar por las realizaciones desveladas, que incluyen cualquiera mostrada en los dibujos o ejemplificada en la memoria descriptiva, que se da a modo de ejemplo o ilustración y no de limitación. Algunas referencias en el presente documento se proporcionan para proporcionar detalles referentes a materiales de partida adicionales, métodos de síntesis adicionales y métodos de análisis adicionales y usos adicionales de la divulgación.

Un experto en la materia apreciaría fácilmente que la presente divulgación está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes en la misma. Las composiciones y métodos y métodos accesorios descritos en el presente documento como actualmente representativos de realizaciones preferidas son a modo de ejemplo. Cambios en la misma y otros usos se les ocurrirán a los expertos en la técnica.

Referencias

1. Addo M. M., Draenert R., Rathod A., Verrill C. L., Davis B. T., Gandhi R. T., Robbins G. K., Basgoz N. O., Stone D. R., Cohen D. E., Johnston M. N., Flynn T., Wurcel A. G., Rosenberg E. S., Altfeld M. and Walker B. D. (2007) Fully Differentiated HIV-1 Specific CD8+ T Effector Cells Are More Frequently Detectable in Controlled than in Progressive HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 2, e321.
2. Aggen D. H., Chervin A. S., Insaiddoo F. K., Piepenbrink K., H., Baker B. M. and Kranz D. M. (2011) Identification and engineering of human variable regions that allow expression of stable single-chain T cell receptors. *Protein Engineering, Design, & Selection* 24, 361-72.
3. Anikeeva N., Mareeva T., Liu W. and Sykulev Y. (2009) Can oligomeric T-cell receptor be used as a tool to detect viral peptide epitopes on infected cells? *Clin Immunol* 130, 98-109.
4. Armstrong K. M., Piepenbrink K. H. and Baker B. M. (2008) Conformational changes and flexibility in T-cell receptor recognition of peptide-MHC complexes. *Biochem J* 415, 183-96.
5. Ashfield R. and Jakobsen B. K. (2006) Making high-affinity T-cell receptors: a new class of targeted therapeutics. *IDrugs* 9, 554-9.
6. Bargou R., Leo E., Zugmaier G., Klinger M., Goebeler M., Knop S., Noppeney R., Viardot A., Hess G., Schuler M., Einsele H., Brandl C., Wolf A., Kirchinger P., Klappers P., Schmidt M., Riethmuller G., Reinhardt C., Baeuerle P. A. and Kufer P. (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 974-7.
7. Benatuil L., Perez J. M., Belk J. and Hsieh C. M. (2010) An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng Des Sel* 23, 155-9.
8. Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. and Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
9. Boder E. T. and Wittrup K. D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotech.* 15, 553-557.
10. Boder E. T. and Wittrup K. D. (2000) Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol* 328, 430-44.
11. Boon T. and Old L. J. (1997) Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 681-3.
12. Borbulevych O. Y., Santhanagopalan S. M., Hossain M. and Baker B. M. (2011) TCRs used in cancer gene therapy cross-react with MART-1/Melan-A tumor antigens via distinct mechanisms. *J Immunol* 187, 2453-63.
13. Brower V. (1997) Enbrel's phase III reinforces prospects in RA [news]. *Nat Biotechnol* 15, 1240.
14. Bulek A. M., Cole D. K., Skowera A., Dolton G., Gras S., Madura F., Fuller A., Miles J. J., Gostick E., Price D. A., Drijfhout J. W., Knight R. R., Huang G. C., Lissin N., Molloy P. E., Wooldridge L., Jakobsen B. K., Rossjohn J., Peakman M., Rizkallah P. J. and Sewell A. K. (2012) Structural basis for the killing of human beta cells by CD8(+) T cells in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 13, 283-9.
15. Cheever M. A., Allison J. P., Ferris A. S., Finn O. J., Hastings B. M., Hecht T. T., Mellman I., Prindiville S. A., Viner J. L., Weiner L. M. and Matrisian L. M. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-37.
16. Chervin A. S., Aggen D. H., Raseman J. M. and Kranz D. M. (2008) Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system. *J Immunol Methods* 339, 175-84.
17. Chervin AS, Stone JD, Soto CM, Engels B, Schreiber H, Roy EJ, and Kranz DM. (2013) Design of T-cell receptor libraries with diverse binding properties to examine adoptive T-cell responses. *Gene Ther.* 20(6):634-44
18. Colby D. W., Kellogg B. A., Graff C. P., Yeung Y. A., Swers J. S. and Wittrup K. D. (2004) Engineering antibody affinity by yeast surface display. *Methods Enzymol* 388, 348-58.
19. Davis M. M. and Bjorkman P. J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
20. Davis M. M., Boniface J. J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B. and Chien Y. (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
21. Ding Y. H., Baker B. M., Garboczi D. N., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1999) Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity* 11, 45-56.
22. Foote J. and Eisen H. N. (2000) Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10679-81.
23. Garboczi D. N., Ghosh P., Utz U., Fan Q. R., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1996) Structure of the

- complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
24. Garcia K. C., Adams J. J., Feng D. and Ely L. K. (2009) The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat Immunol* 10, 143-7.
- 5 25. Haidar J. N., Pierce B., Yu Y., Tong W., Li M. and Weng Z. (2009) Structure-based design of a T-cell receptor leads to nearly 100-fold improvement in binding affinity for pepMHC. *Proteins* 74, 948-60.
26. Harkioliaki M., Holmes S. L., Svendsen P., Gregersen J. W., Jensen L. T., McMahon R., Friese M. A., van Boxel G., Etzensperger R., Tzartos J. S., Kranc K., Sainsbury S., Harlos K., Mellins E. D., Palace J., Esiri M. M., van der Merwe P. A., Jones E. Y. and Fugger L. (2009) T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348-57.
- 10 27. Hawse W. F., Champion M. M., Joyce M. V., Hellman L. M., Hossain M., Ryan V., Pierce B. G., Weng Z. and Baker B. M. (2012) Cutting edge: evidence for a dynamically driven T cell signaling mechanism. *J Immunol* 188, 5819-23.
28. Holler P. D., Chlewicki L. K. and Kranz D. M. (2003) TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity. *Nat Immunol* 4, 55-62.
- 15 29. Holler P. D., Holman P. O., Shusta E. V., O'Herrin S., Wittrup K. D. and Kranz D. M. (2000) In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5387-92.
30. Holliger P., Prospero T. and Winter G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6444-8.
- 20 31. Hoogenboom H. R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23, 1105-16.
32. Jarvis L. M. (2012) Rethinking Antibody-Drug Conjugates. *Chemical and Engineering News* 90, 12-18.
33. Kessels H. W., van Den Boom M. D., Spits H., Hooijberg E. and Schumacher T. N. (2000) Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14578-83.
- 25 34. Kieke M. C., Shusta E. V., Boder E. T., Teyton L., Wittrup K. D. and Kranz D. M. (1999) Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5651-6.
- 35 35. Lauck F., Smith C. A., Friedland G. F., Humphris E. L. and Kortemme T. (2010) RosettaBackrub--a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. *Nucleic Acids Res* 38, W569-75.
36. Li Y., Moysey R., Molloy P. E., Vuidepot A. L., Mahon T., Baston E., Dunn S., Liddy N., Jacob J., Jakobsen B. K. and Boulter J. M. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat Biotechnol* 23, 349-54.
- 30 37. Liddy N., Bossi G., Adams K. J., Lissina A., Mahon T. M., Hassan N. J., Gavarret J., Bianchi F. C., Pumphrey N. J., Ladell K., Gostick E., Sewell A. K., Lissin N. M., Harwood N. E., Molloy P. E., Li Y., Cameron B. J., Sami M., Baston E. E., Todorov P. T., Paston S. J., Dennis R. E., Harper J. V., Dunn S. M., Ashfield R., Johnson A., McGrath Y., Plesa G., June C. H., Kalos M., Price D. A., Vuidepot A., Williams D. D., Sutton D. H. and Jakobsen B. K. (2012) Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med*.
- 35 38. Litvak-Greenfeld D. and Benhar I. (2012) Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*.
39. Manning T. C. and Kranz D. M. (1999) Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences. *Immunology Today* 20, 417-422.
- 40 40. Marrack P., Scott-Browne J. P., Dai S., Gapin L. and Kappler J. W. (2008) Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu Rev Immunol* 26, 171-203.
41. Marsh S. G. E., Parham P. and Barber L. D. (2000) *The HLA Facts Book*. Academic Press, London.
42. Mason D. (1998) A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T- cell receptor. *Immunol Today* 19, 395-404.
- 45 43. Miller B. R., Demarest S. J., Lugovskoy A., Huang F., Wu X., Snyder W. B., Croner L. J., Wang N., Amatucci A., Michaelson J. S. and Glaser S. M. (2010) Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. *Protein Eng Des Sel* 23, 549-57.
44. Molloy P. E., Sewell A. K. and Jakobsen B. K. (2005) Soluble T cell receptors: novel immunotherapies. *Curr Opin Pharmacol* 5, 438-43.
- 50 45. Murphy K. (2012) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York.
46. Nold M. F., Nold-Petry C. A., Zepp J. A., Palmer B. E., Bufler P. and Dinarello C. A. (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 11, 1014-22.
47. Pastan I., Hassan R., Fitzgerald D. J. and Kreitman R. J. (2006) Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 559-65.
- 55 48. Pierce B. G., Haidar J. N., Yu Y. and Weng Z. (2010) Combinations of affinity-enhancing mutations in a T cell receptor reveal highly nonadditive effects within and between complementarity determining regions and chains. *Biochemistry* 49, 7050-9.
49. Porter D. L., Levine B. L., Kalos M., Bagg A. and June C. H. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365, 725-33.
- 60 50. Reichert J. M. and Valge-Archer V. E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 349-56.
51. Ricart A. D. and Tolcher A. W. (2007) Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 245-55.
- 65 52. Richman S. A., Aggen D. H., Dossett M. L., Donermeyer D. L., Allen P. M., Greenberg P. D. and Kranz D. M. (2009) Structural features of T cell receptor variable regions that enhance domain stability and enable expression as single-chain Valpha/Vbeta fragments. *Mol Immunol* 46, 902-16.

53. Richman S. A. and Kranz D. M. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors. *Biomol Eng* 24, 361-73.
54. Rock K. L. and Goldberg A. L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-79.
55. Rudolph M. G., Stanfield R. L. and Wilson I. A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-66.
56. Sadelain M., Brentjens R. and Riviere I. (2009) The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 21, 215-23.
57. Sami M., Rizkallah P. J., Dunn S., Molloy P., Moysey R., Vuidepot A., Baston E., Todorov P., Li Y., Gao F., Boulter J. M. and Jakobsen B. K. (2007) Crystal structures of high affinity human T-cell receptors bound to peptide major histocompatibility complex reveal native diagonal binding geometry. *Protein Eng Des Sel* 20, 397-403.
58. Schrama D., Reisfeld R. A. and Becker J. C. (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 147-59.
59. Scott J. K. and Smith G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-90.
60. Skowera A., Ellis R. J., Varela-Calvino R., Arif S., Huang G. C., Van-Krinks C., Zaremba A., Rackham C., Allen J. S., Tree T. I., Zhao M., Dayan C. M., Sewell A. K., Unger W. W., Drijfhout J. W., Ossendorp F., Roep B. O. and Peakman M. (2008) CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest* 118, 3390-402.
61. Smith C. A. and Kortemme T. (2008) Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J Mol Biol* 380, 742-56.
62. Soo Hoo W. F., Lacy M. J., Denzin L. K., Voss E. W. J., Hardman K. D. and Kranz D. M. (1992) Characterization of a single-chain T cell receptor expressed in *E. Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4759-4763.
63. Starr T. K., Jameson S. C. and Hogquist K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-76.
64. Starwalt S. E., Masteller E. L., Bluestone J. A. and Kranz D. M. (2003) Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Eng* 16, 147-56.
65. Stone J. D., Chervin A. S., Aggen D. H. and Kranz D. M. (2012) T cell receptor engineering. *Methods Enzymol* 503, 189-222.
66. Stone J. D., Yin Y., Mo M., Weber K. S., Donermeyer D. L., Allen P. M., Mariuzza R. A. and Kranz D. M. (2012) Engineering High-Affinity T Cell Receptor/ Cytokine Fusions for Therapeutic Targeting. In *Protein Engineering* (Edited by Kaumaya P.). InTech.
67. Stroncek D. F., Berger C., Cheever M. A., Childs R. W., Dudley M. E., Flynn P., Gattinoni L., Heath J. R., Kalos M., Marincola F. M., Miller J. S., Mostoslavsky G., Powell D. J., Jr., Rao M., Restifo N. P., Rosenberg S. A., O'Shea J. and Melief C. J. (2012) New directions in cellular therapy of cancer: a summary of the summit on cellular therapy for cancer. *J Transl Med* 10, 48.
68. Swers J. S., Kellogg B. A. and Wittrup K. D. (2004) Shuffled antibody libraries created by in vivo homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Res* 32, e36.
69. Tayal V. and Kalra B. S. (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* 579, 1-12.
70. Thakur A. and Lum L. G. (2010) Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience. *Curr Opin Mol Ther* 12, 340-9.
71. Tonegawa S. (1988) Nobel lecture in physiology or medicine--1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 253-65.
72. Tsomides T. J., Aldovini A., Johnson R. P., Walker B. D., Young R. A. and Eisen H. N. (1994) Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 180, 1283-93.
73. Turner D. J., Ritter M. A. and George A. J. (1997) Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods* 205, 43-54.
74. Utz U., Banks D., Jacobson S. and Biddison W. E. (1996) Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. *J Virol* 70, 843-51.
75. Varela-Rohena A., Molloy P. E., Dunn S. M., Li Y., Suhoski M. M., Carroll R. G., Milicic A., Mahon T., Sutton D. H., Laugel B., Moysey R., Cameron B. J., Vuidepot A., Purbhoo M. A., Cole D. K., Phillips R. E., June C. H., Jakobsen B. K., Sewell A. K. and Riley J. L. (2008) Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat Med* 14, 1390-5.
76. Weber K. S., Donermeyer D. L., Allen P. M. and Kranz D. M. (2005) Class II-restricted T cell receptor engineered in vitro for higher affinity retains peptide specificity and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19033-8.
77. Wong R. L., Liu B., Zhu X., You L., Kong L., Han K. P., Lee H. I., Chavillaz P. A., Jin M., Wang Y., Rhode P. R. and Wong H. C. (2011) Interleukin-15:Interleukin-15 receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. *Protein Eng Des Sel* 24, 373-83.

Patentes de EE.UU.

- 5 7.569.357; presentada 20-Febrero-04; concedida 4-Agosto-09; Board of Trustees University of Illinois. High affinity TCR proteins and methods.
- 7.465.787; presentada 16-Diciembre-03; concedida 16-Diciembre-08; Board of Trustees University of Illinois. Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.
- 10 6.759.243; presentada 6-Diciembre-00; concedida 6-Julio-04; Board of Trustees University of Illinois. High affinity TCR proteins and methods.
- 6.699.658; presentada 20-Enero-98; concedida 2-Marzo-04; Board of Trustees University of Illinois. Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.
- 15 6.696.251; presentada 28-Noviembre-00; concedida 24-Febrero-04; Board of Trustees University of Illinois. Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.
- 20 6.423.538; presentada 28-Noviembre-00; concedida 23-Julio-02; Board of Trustees University of Illinois. Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.
- 6.300.065; presentada 26-Agosto-98; concedida 9-October-01; Board of Trustees University of Illinois. Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.
- 25 8.143.376; presentada 18-Mayo-05; concedida 27-Marzo-12; Immunocore Limited; High affinity NY-ESO T cell receptor.
- 8.088.379; presentada 26-Septiembre-07; concedida 3- Enero-12; Immunocore Limited; Modified T cell receptors and related materials and methods.
- 30 8.017.730; presentada 19-Mayo-06; concedida 13-Septiembre-11; Immunocore Limited; T cell receptors which bind to VYGFVRACL-HLA-A24.
- 7.763.718; presentada 29-October-07; concedida 27-Julio-10; Immunocore Limited; Soluble T cell receptors.
- 35 7.666.604; presentada 9-Julio-03; concedida 23-Febrero-10; Immunocore Limited; Modified soluble T cell receptor.
- 7.608.410; presentada 7-October-08; concedida 27-October-09; Immunocore Limited; Method of improving T cell receptors.
- 40 7.569.664; presentada 3-October-03; concedida 4-Agosto-09; Immunocore Limited; Single chain recombinant T cell receptors.
- 45 8.105.830; presentada 5-Noviembre-02; concedida 31-Enero-12; Altor Bioscience Corporation; Polyspecific binding molecules and uses thereof.
- 6.534.633; presentada 21-October-99; 18-Marzo-03; Altor Bioscience Corporation; Polyspecific binding molecules and uses thereof.

50 **Listado de secuencias**

- <110> Board of Trustees of the University of Illinois Fred Hutchinson Cancer Research Center Smith, Sheena N. Harris, Daniel T. Kranz, David M. Greenberg, Philip D. Schmitt, Thomas M.
- 55 <120> RECEPTORES DE LINFOCITOS T HUMANOS DE ALTA AFINIDAD MODIFICADOS
- <130> IMMU-003/02WO
- <150> US 61/907.887
- 60 <151> 22-11-2013
- <160> 34
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1

ES 2 729 406 T3

<211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
 20 25 30
 Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
 35 40 45
 Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60
 Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Ile
 85 90 95
 Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
 100 105 110
 Leu Lys Asn
 115

10 <210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 2

ES 2 729 406 T3

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Ser
 20 25 30
 Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
 35 40 45
 Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
 50 55 60
 Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
 85 90 95
 Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
 100 105 110

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región beta variable modificada del TCR con alta afinidad por WT1/HLA-A2

<400> 3

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
 20 25 30
 Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Ser Tyr Gly Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60
 Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
 65 70 75 80

5

10

ES 2 729 406 T3

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Asn Tyr
 85 90 95

Leu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
 100 105 110

Leu Lys Asn
 115

5 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región alfa variable modificada del TCR con alta afinidad por WT1/HLA-A2
 <400> 4

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Asp Leu Gly Ser
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
 35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
 85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
 100 105 110

15 <210> 5
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> TCR monocatenario que se une con alta afinidad a WT1/HLA-A2
 <400> 5

ES 2 729 406 T3

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

<210> 6
<211> 9

ES 2 729 406 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus linfotrópico de linfocitos T humanos

10

<400> 7

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 1 5

15

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia conectora de aminoácidos

25

<400> 8

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Corte y empalme de cebador 4L

35

<400> 9
 ggcagcccca taaacacaca gtat 24

40

<210> 10
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador inverso usado para generar la biblioteca CDR1alfa de WT1-D13

<400> 10

acgatcgcta taggtgcagt tcaatgatgc aatagcacct tccgggacac ttaatgggcc 60

50

gct 63

<210> 11
 <211> 81
 <212> ADN

ES 2 729 406 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR1alfa de WT1-D13

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n = cualquier base

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n = cualquier base

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n = cualquier base

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n = cualquier base

25

<400> 11

attgcatcat tgaactgcac ctatagcgat cgtnnnsnnsn nsnnsttctt ttggtataga 60

cagtacagtg gcaaatcccc g 81

30

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador T7

<400> 12

taatacgact cactataggg 20

40

<210> 13

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Cebador inverso usado para generar la biblioteca de CDR3 beta1 de WT1-D13.1

<400> 13

50

tgcacacagg tacatggaag tttgattggt actagcgctt tccagaatca aactgaaacg 60

ttcttt 66

<210> 14

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR3 beta1 de WT1-D13.1

60

<220>

ES 2 729 406 T3

<221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> n = cualquier base

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> n = cualquier base

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n = cualquier base

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n = cualquier base

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n es a, c, g o t

25

<400> 14

agtaccaatc aaacttccat gtacctgtgt gcannsnnsn nsnnsnnsnga acagtttttc **60**
ggcccaggta caagattaac ggtg **84**

30

<210> 15
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador inverso usado para generar la biblioteca de CDR3 beta2 de WT1-D13.1

<400> 15

tgcacacagg tacatggaag tttgattggt actagcgctt tccagaatca aactgaaacg **60**
ttcttt **66**

40

<210> 16
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR3 beta2 de WT1-D13.1

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n = cualquier base

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n = cualquier base

60

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 729 406 T3

<222> (52)..(53)
 <223> n = cualquier base

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n = cualquier base

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n es a, c, g o t

15 <400> 16
 agtaccaatc aaacttccat gtacctgtgt gcaagcagtt ccatcnnnsn snnsnnsnns 60
 ggcccaggta caagattaac ggtg 84

20 <210> 17
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador inverso usado para generar la biblioteca de CDR3 alfa1 de WT1-D13.1

<400> 17
 ggcgcacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggattaaca gagagacata 60
 ctggga 66

30 <210> 18
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR3 alfa1 de WT1-D13.1

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> n = cualquier base

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> n = cualquier base

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n = cualquier base

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n = cualquier base

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n es a, c, g o t

ES 2 729 406 T3

<400> 18

caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gccnnsnnsn nsnnsnnsaa tatgctgacc 60

ttcgggtggcg gtactcgott aatg 84

5

<210> 19
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador inverso usado para generar la biblioteca de CDR3 alfa2 de WT1-D13.1

15

<400> 19

ggcgcacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggattaaca gagagacata 60

ctggga 66

<210> 20
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador directo usado para generar la biblioteca de CDR3 alfa2 de WT1-D13.1

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n = cualquier base

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n = cualquier base

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n = cualquier base

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n = cualquier base

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n es a, c, g o t

50

<400> 20

caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gccgcgaata acgcgnnsnn snnsnnsnns 60

ttcgggtggcg gtactcgctt aatg 84

55

<210> 21
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 729 406 T3

<220>

<223> Región beta variable modificada del TCR con alta afinidad por WT1/HLA-A2

<400> 21

5

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Ile
85 90 95

Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
100 105 110

Leu Lys Asn
115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Región alfa variable modificada del TCR con alta afinidad por WT1/HLA-A2

15

<400> 22

ES 2 729 406 T3

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Pro
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
 35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
 85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
 100 105 110

5 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Gripe A

<400> 23

10 Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met
 1 5

15 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Gripe A

<400> 24

20 Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
 1 5

25 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

<400> 25

30 Lys Leu Phe Ser Gln Leu Ser Tyr Leu
 1 5

<210> 26
 <211> 9

ES 2 729 406 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

<400> 26

Lys Leu Phe Ser Thr Ala Met Phe Leu
1 5

10 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

<400> 27

20 **His Met Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile**
1 5

25 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

<400> 28

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

35 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

<400> 29

Lys Ile Phe Pro Ser Cys Leu Phe Val
1 5

45 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1

55 <400> 30

ES 2 729 406 T3

Lys Leu Trp Pro Ser Val Ala Phe Ala
1 5

5 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1
<400> 31

His Leu Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile
1 5

15 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1
<400> 32

Arg Ile Trp Leu Ser Val Val Phe Val
1 5

25 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1
<400> 33

His Leu Phe Ser Ser Leu Pro Phe Ala
1 5

40 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido humano estructuralmente similar a WT1
<400> 34

Arg Ile Phe Ser Thr Ala Leu Phe Val
1 5

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de linfocitos T modificado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una V α y una V β derivadas de un receptor de linfocitos T no mutante, en el que la V α comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 y la V β comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, en el que el receptor de linfocitos T modificado se une a un complejo del péptido WT1 y la molécula HLA-A2 con mayor afinidad que el receptor de linfocitos T no mutante.
- 10 2. El receptor de linfocitos T modificado de la reivindicación 1, en el que el receptor de linfocitos T modificado comprende el receptor de linfocitos T monocatenario con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.
- 15 3. El receptor de linfocitos T modificado de la reivindicación 1 que se une a un complejo del péptido WT1 y la molécula HLA-A2 con una afinidad nanomolar o mayor, en el que el receptor de linfocitos T modificado se une al complejo con un valor K_D de 10⁻⁶ M a 10⁻¹² M.
- 20 4. El receptor de linfocitos T modificado de la reivindicación 1 que está en forma soluble.
5. Un agente terapéutico que se dirige a células cancerosas que expresan el antígeno WT1, en el que el agente terapéutico comprende el receptor de linfocitos T modificado de la reivindicación 3.
- 25 6. Un agente terapéutico que se dirige a células cancerosas que expresan el antígeno WT1, en el que el agente terapéutico comprende un linfocito T humano que expresa el receptor de linfocitos T modificado de la reivindicación 1.
7. El agente terapéutico de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa el antígeno WT1.
- 30 8. El agente terapéutico de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa el antígeno WT1.

Cadena Vb		Cadena Va	
WT1 P22	D V K V T Q S S R Y L V K R T G E K V F L E C V Q D M D H E N M F W Y R Q D P G L G L R L Y S Y D V K M K E	WT1 P22	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13	D V K V T Q S S R Y L V K R T G E K V F L E C V Q D M D H E N M F W Y R Q D P G L G L R L Y S Y D V K M K E	WT1 D13	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.1	D V K V T Q S S R Y L V K R T G E K V F L E C V Q D M D H E N M F W Y R Q D P G L G L R L Y S Y D V K M K E	WT1 D13.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.0.1	D V K V T Q S S R Y L V K R T G E K V F L E C V Q D M D H E N M F W Y R Q D P G L G L R L Y S Y D V K M K E	WT1 D13.0.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.1.1	D V K V T Q S S R Y L V K R T G E K V F L E C V Q D M D H E N M F W Y R Q D P G L G L R L Y S Y D V K M K E	WT1 D13.1.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
Vb (continuación)		Va (continuación)	
WT1 P22	K G D I P E G G - Y S V S R R E - K K E R F F S L I L E S A S T N Q T S M Y L C A S S S - - - - - Q F F G P G T R L T V L E D L K N	WT1 P22	E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T Y L C A A N - - - - - R L M V K P H I
WT1 D13	K G D I P E G G - Y S V S R R E - K K E R F F S L I L E S A S T N Q T S M Y L C A S S S - - - - - Q F F G P G T R L T V L E D L K N	WT1 D13	E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T Y L C A A N - - - - - R L M V K P H I
WT1 D13.1	K G D I P E G G - Y S V S R R E - K K E R F F S L I L E S A S T N Q T S M Y L C A S S S - - - - - Q F F G P G T R L T V L E D L K N	WT1 D13.1	E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T Y L C A A N - - - - - R L M V K P H I
WT1 D13.0.1	K G D I P E G G - Y S V S R R E - K K E R F F S L I L E S A S T N Q T S M Y L C A S S S - - - - - Q F F G P G T R L T V L E D L K N	WT1 D13.0.1	E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T Y L C A A N - - - - - R L M V K P H I
WT1 D13.1.1	K G D I P E G G - Y S V S R R E - K K E R F F S L I L E S A S T N Q T S M Y L C A S S S - - - - - Q F F G P G T R L T V L E D L K N	WT1 D13.1.1	E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T Y L C A A N - - - - - R L M V K P H I
Conector		Conector	
WT1 P22	G S A D D A K K D A A K K D G K S	WT1 P22	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13	G S A D D A K K D A A K K D G K S	WT1 D13	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.1	G S A D D A K K D A A K K D G K S	WT1 D13.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.0.1	G S A D D A K K D A A K K D G K S	WT1 D13.0.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K
WT1 D13.1.1	G S A D D A K K D A A K K D G K S	WT1 D13.1.1	Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R V S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G D K

FIG. 1

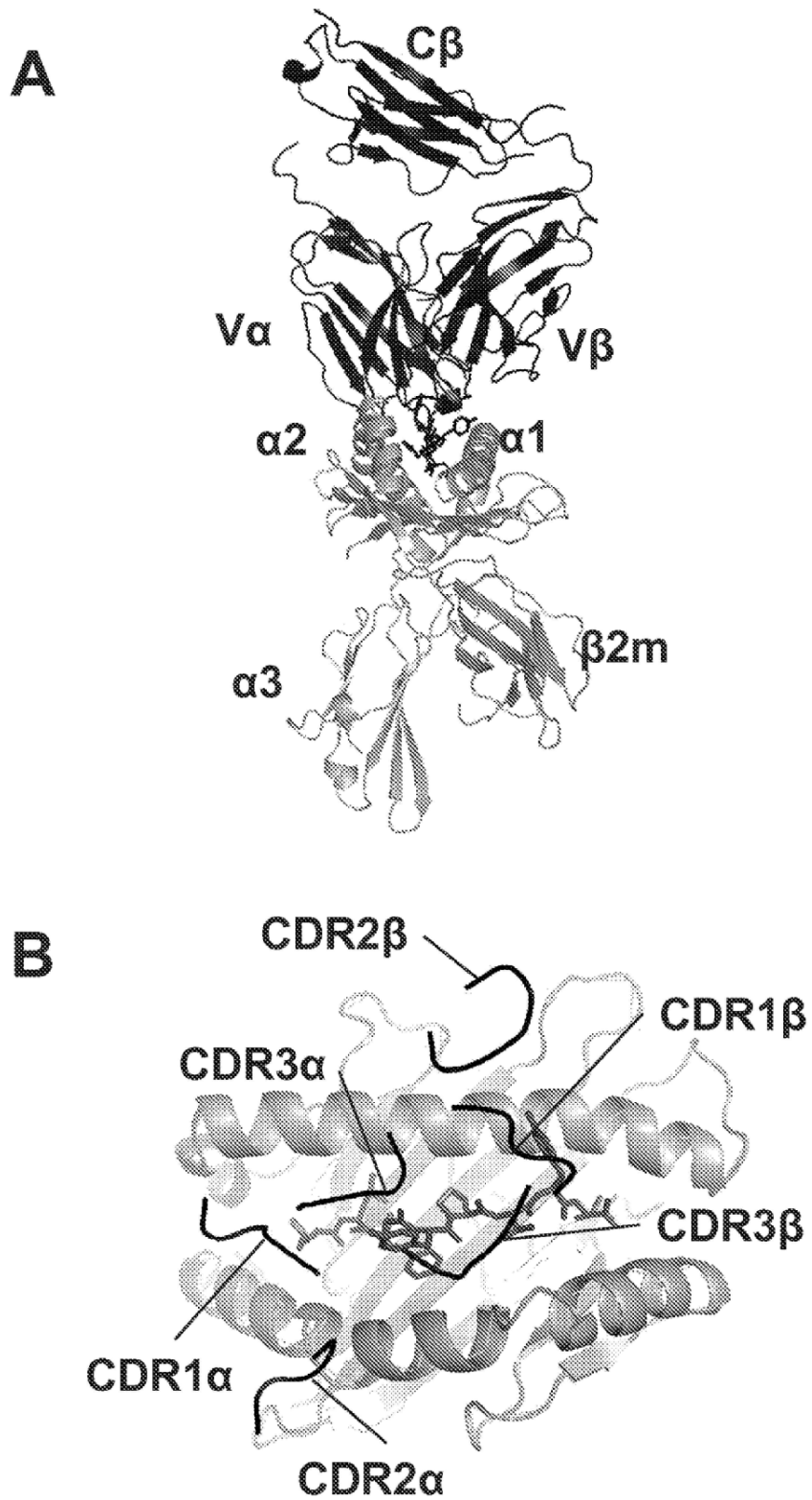


FIG. 2

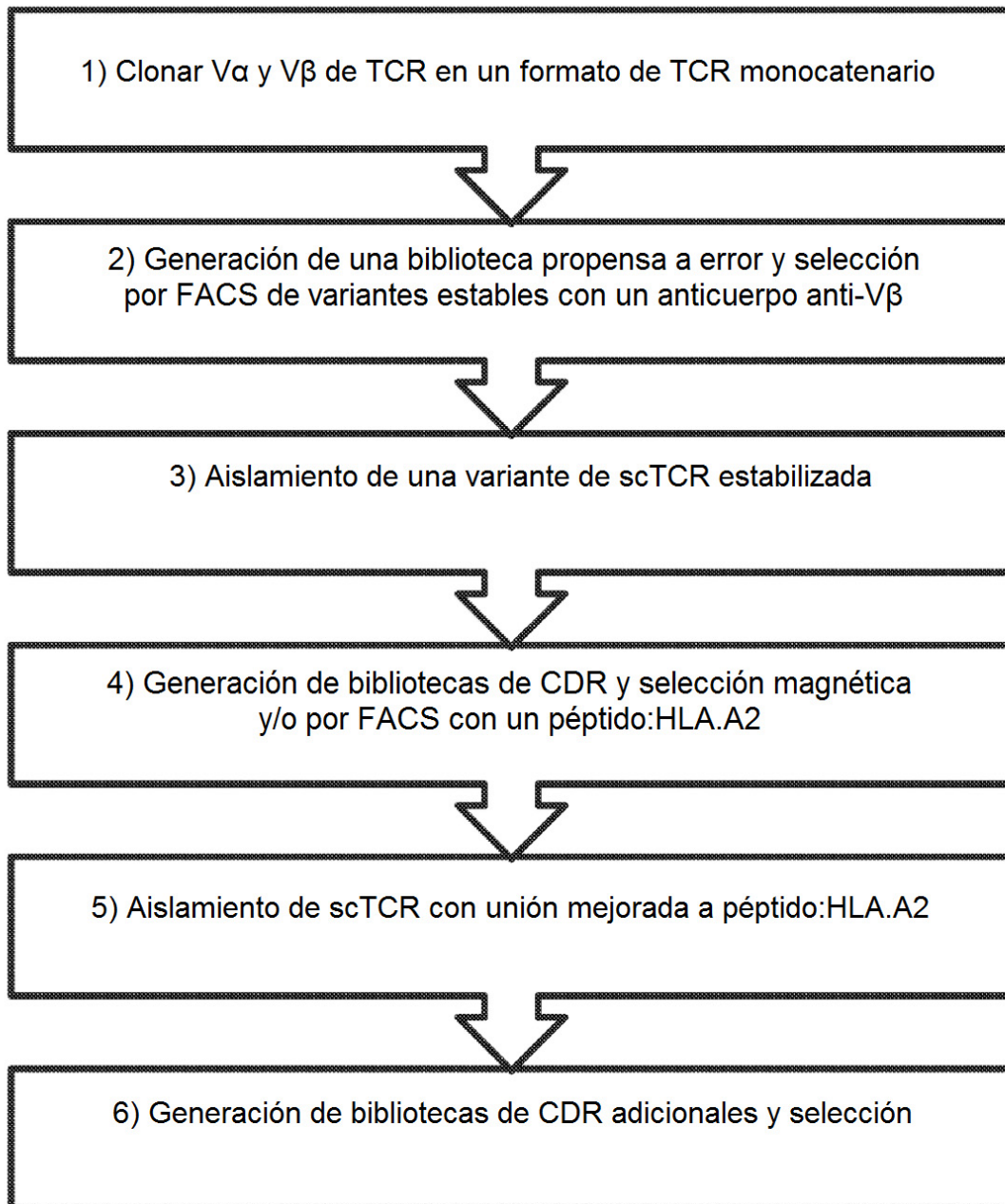


FIG. 3

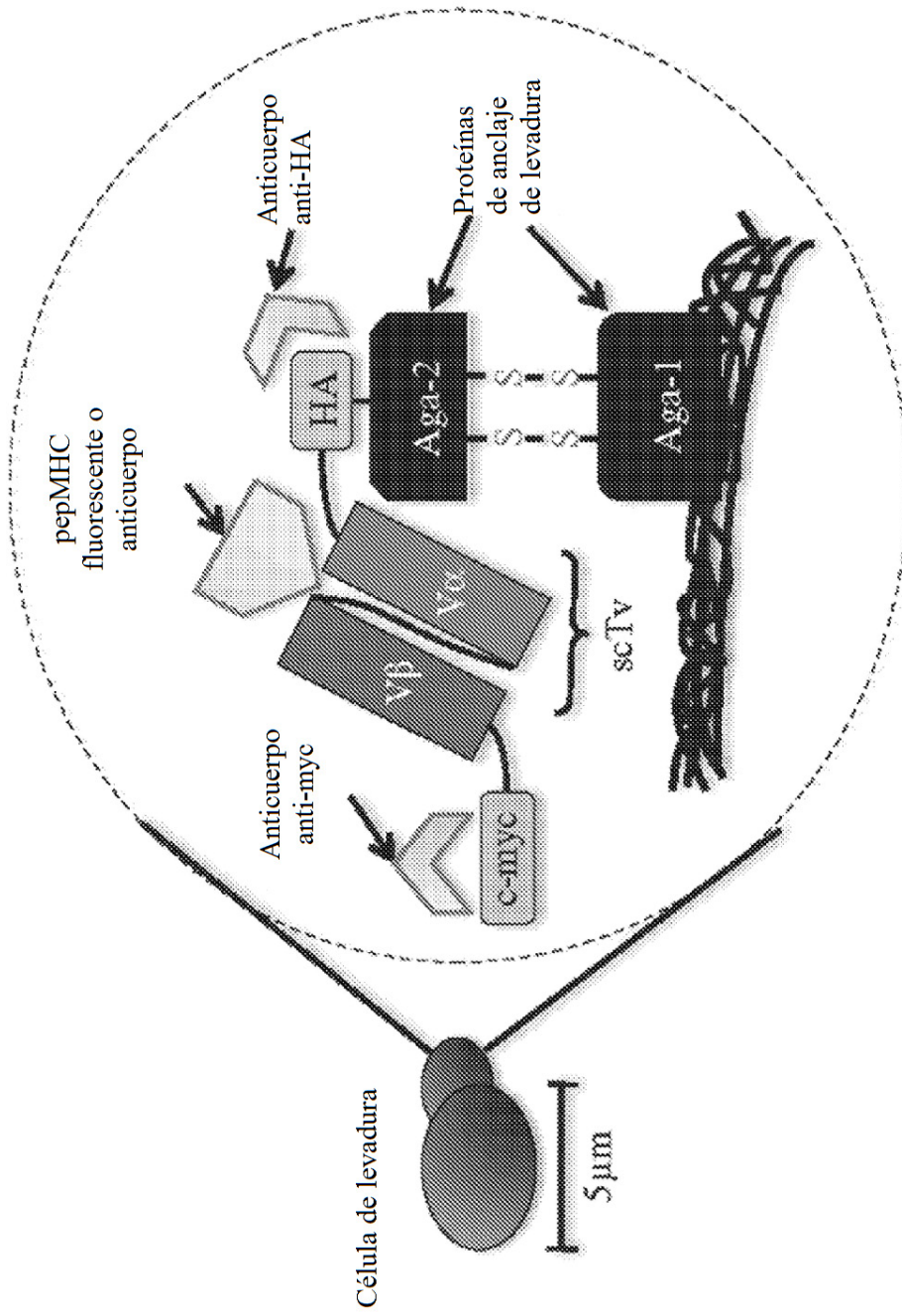


FIG. 4

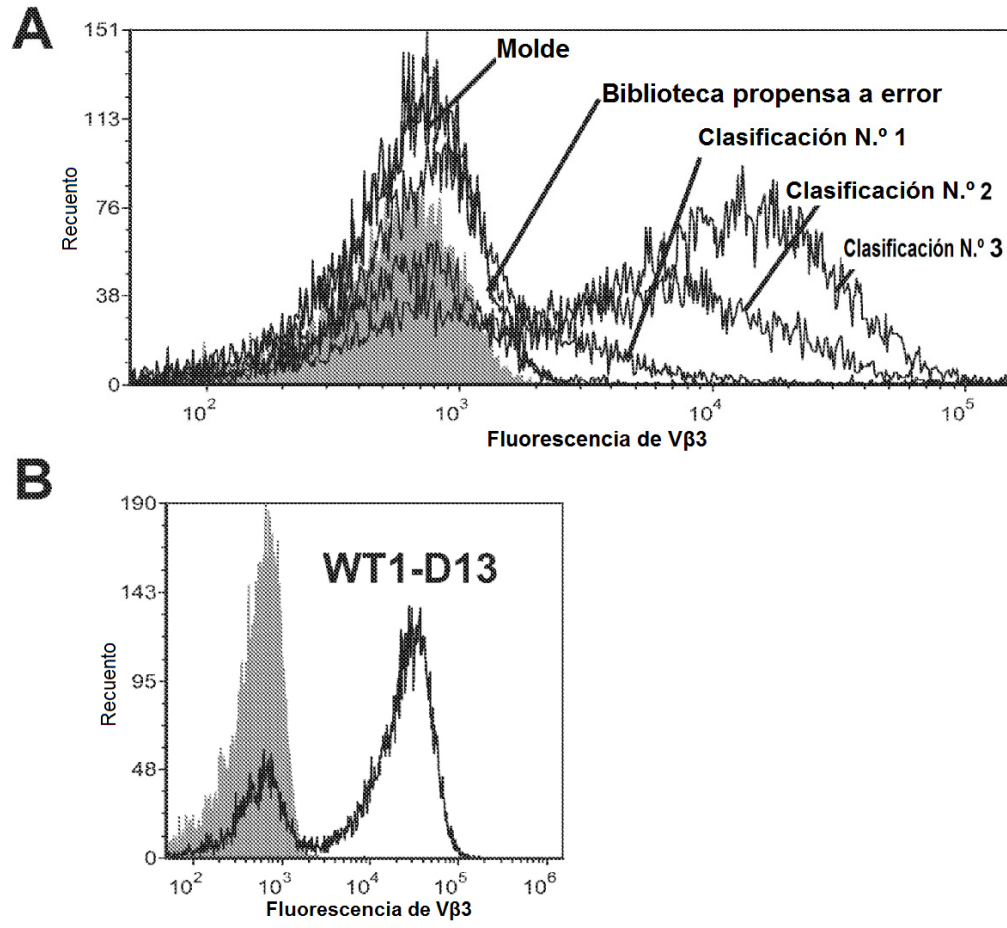


FIG. 5

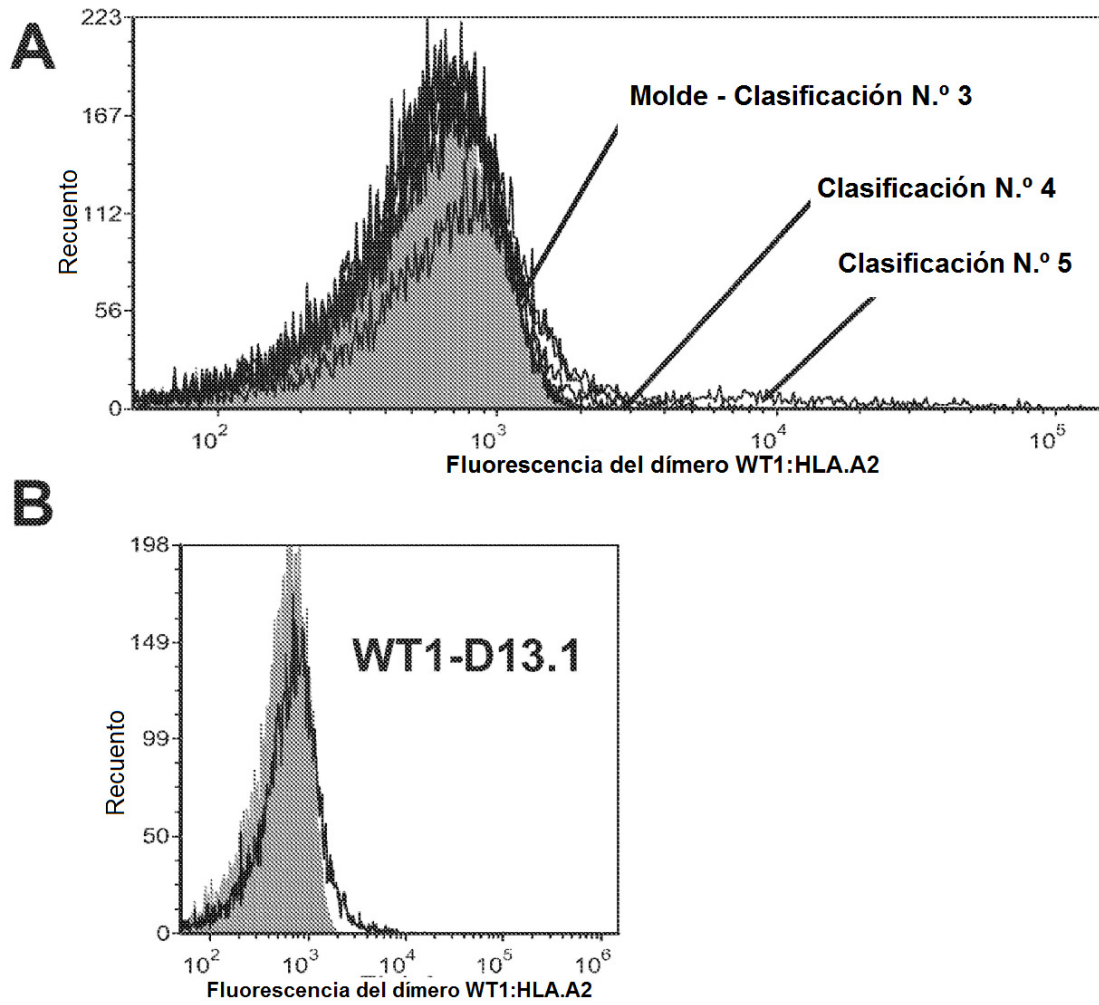


FIG. 6

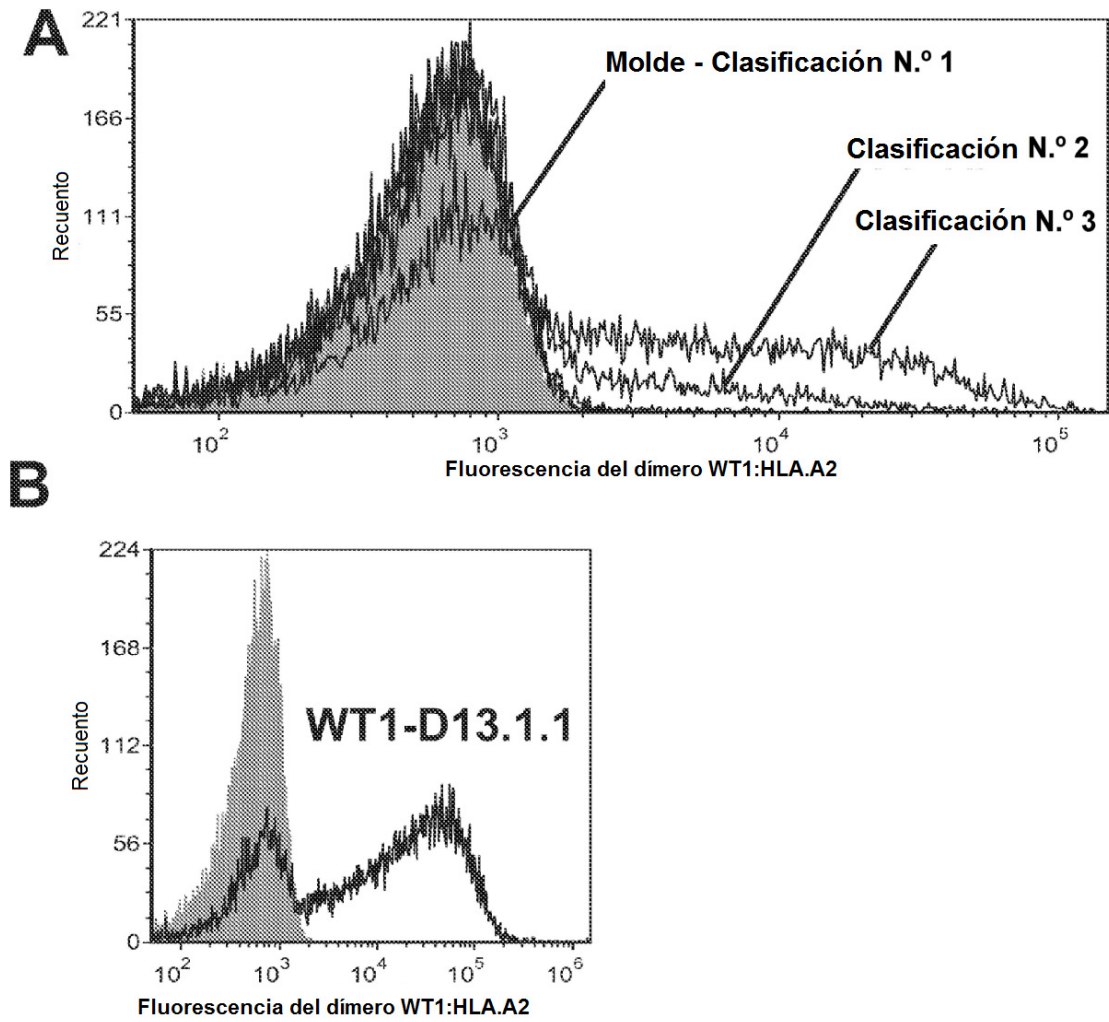


FIG. 7

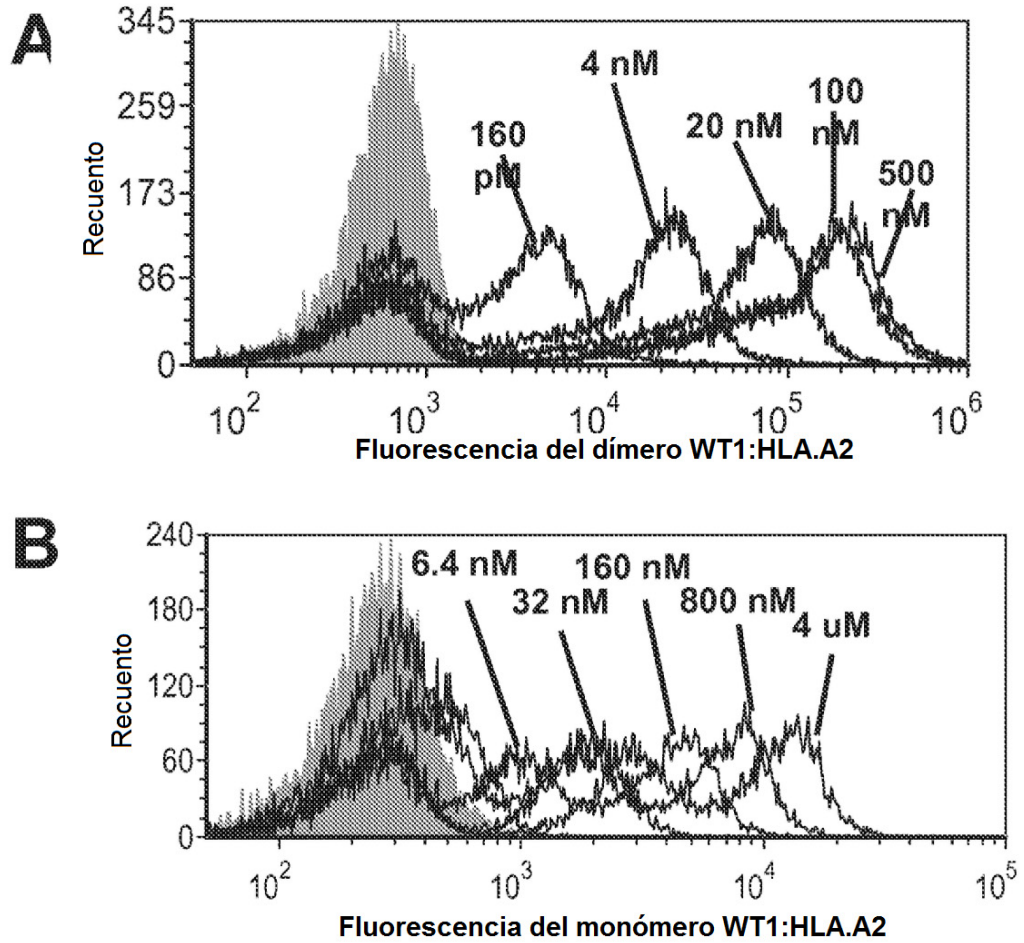


FIG. 8

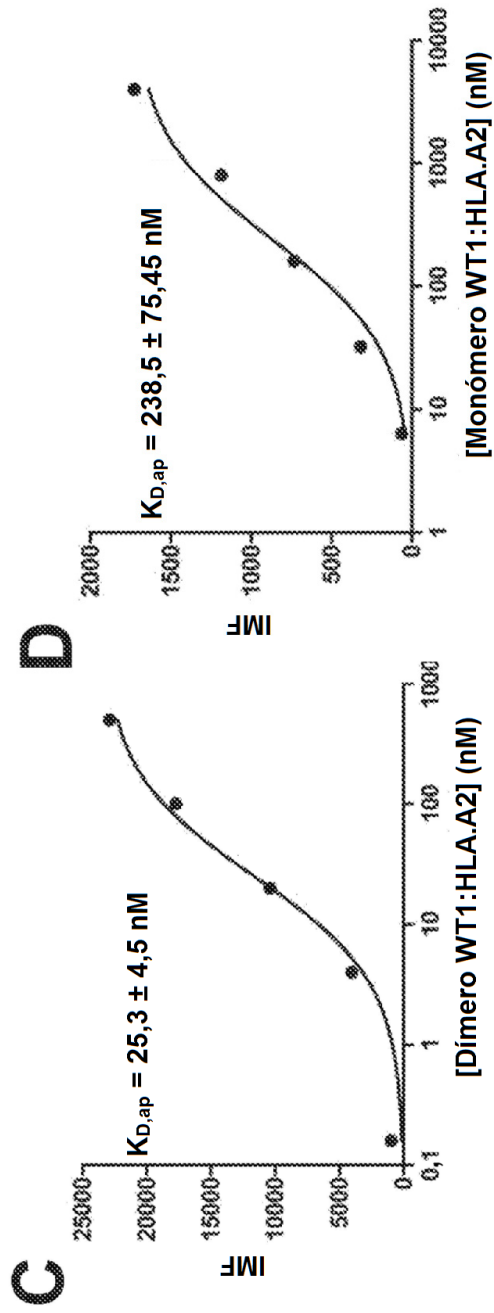


FIG. 8

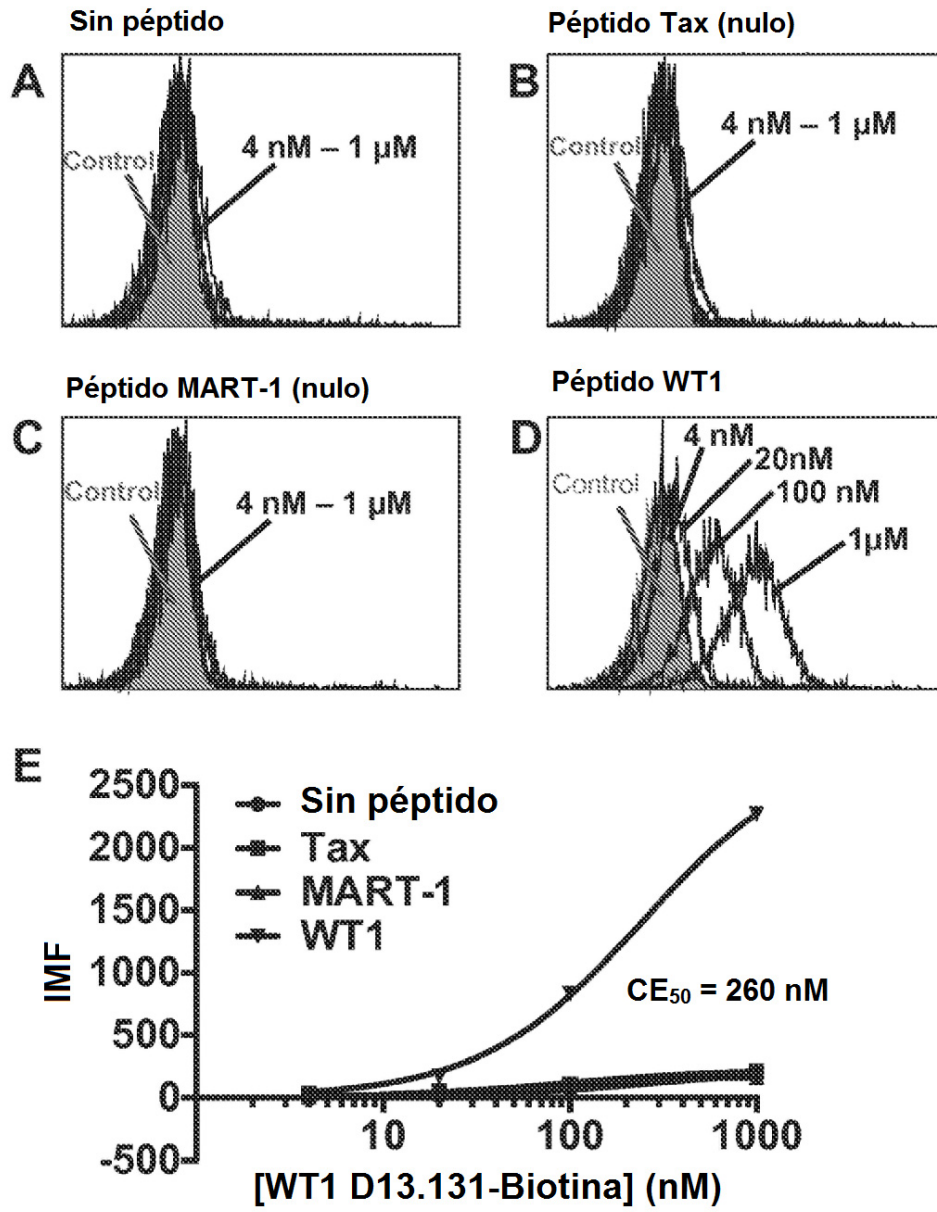
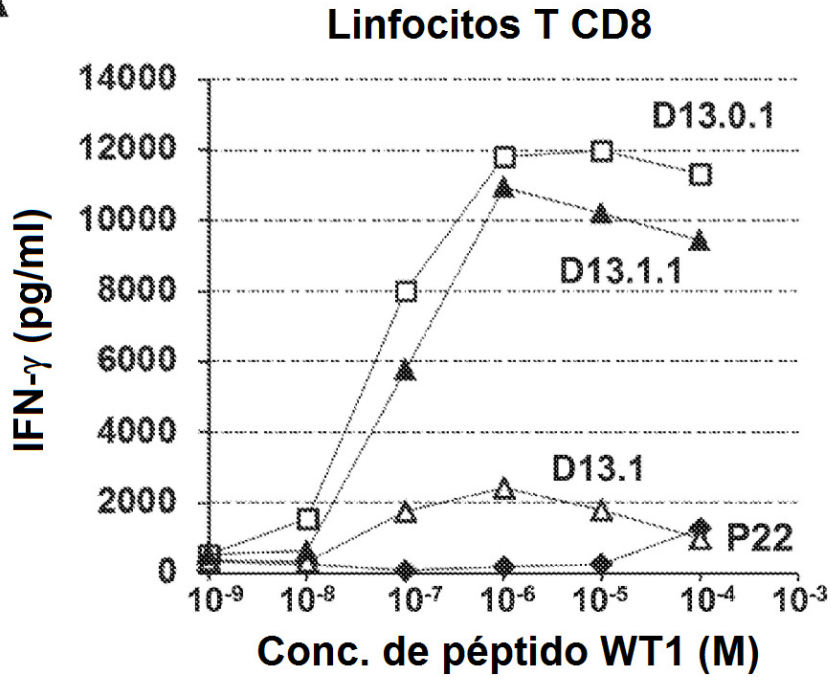


FIG. 9

A



B

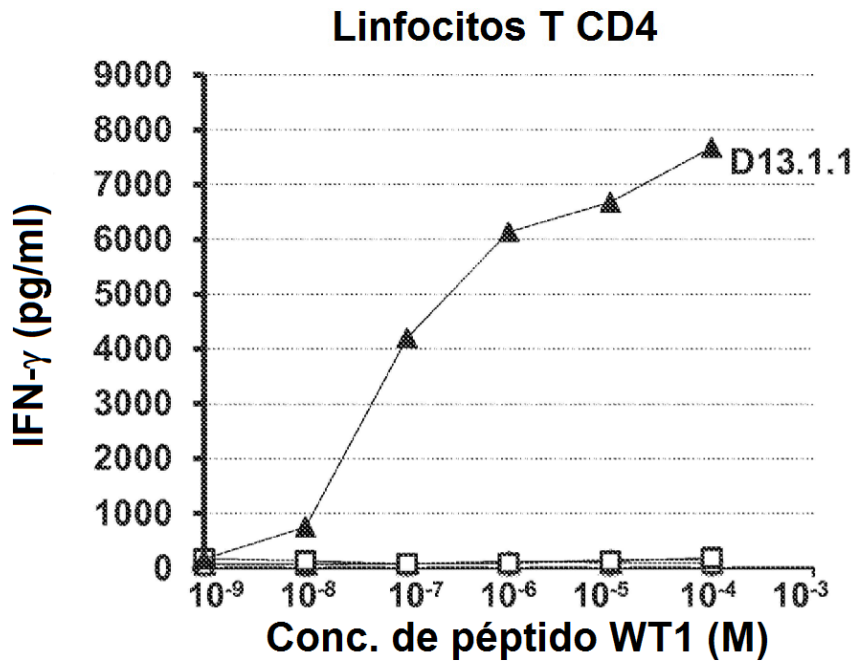


FIG. 10

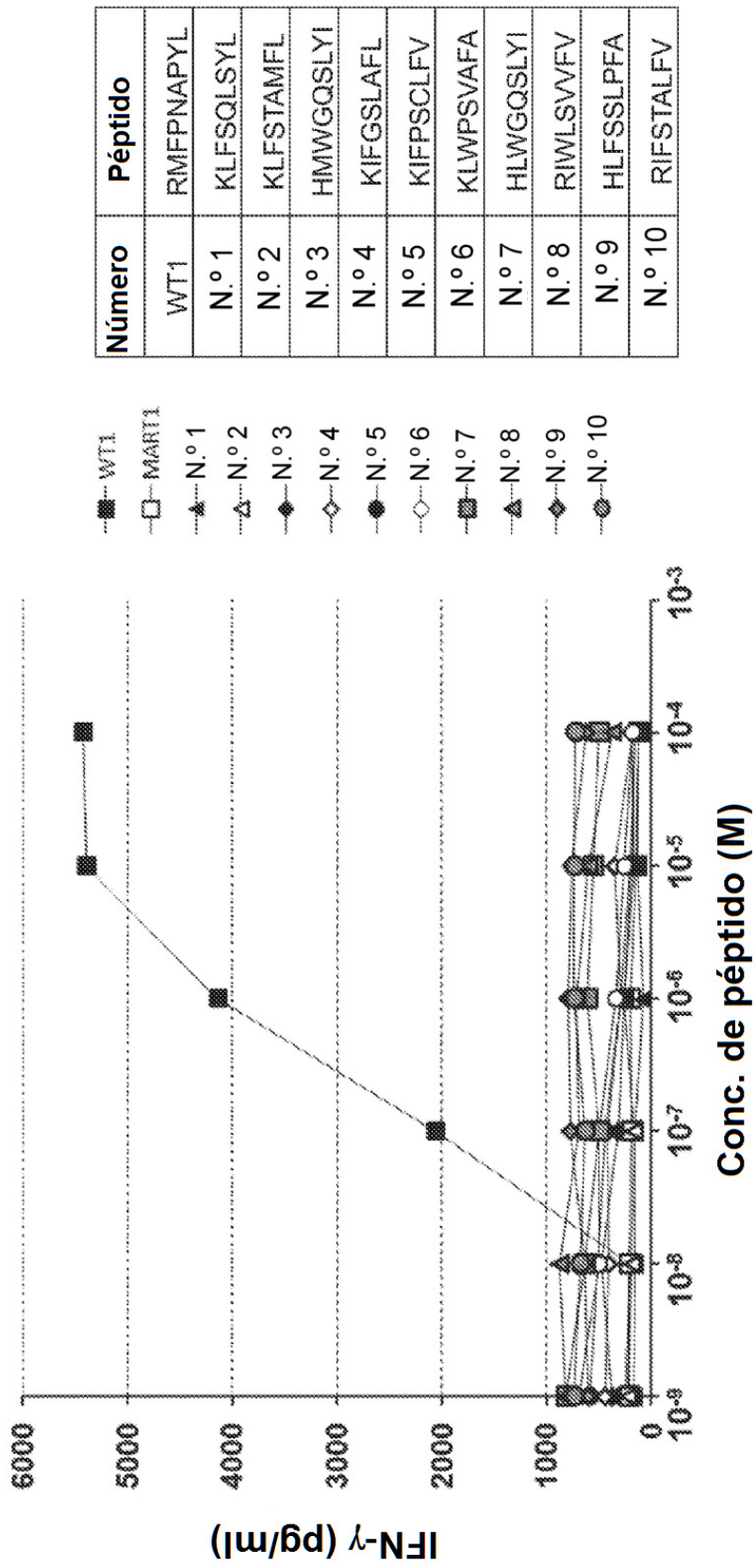


FIG. 11

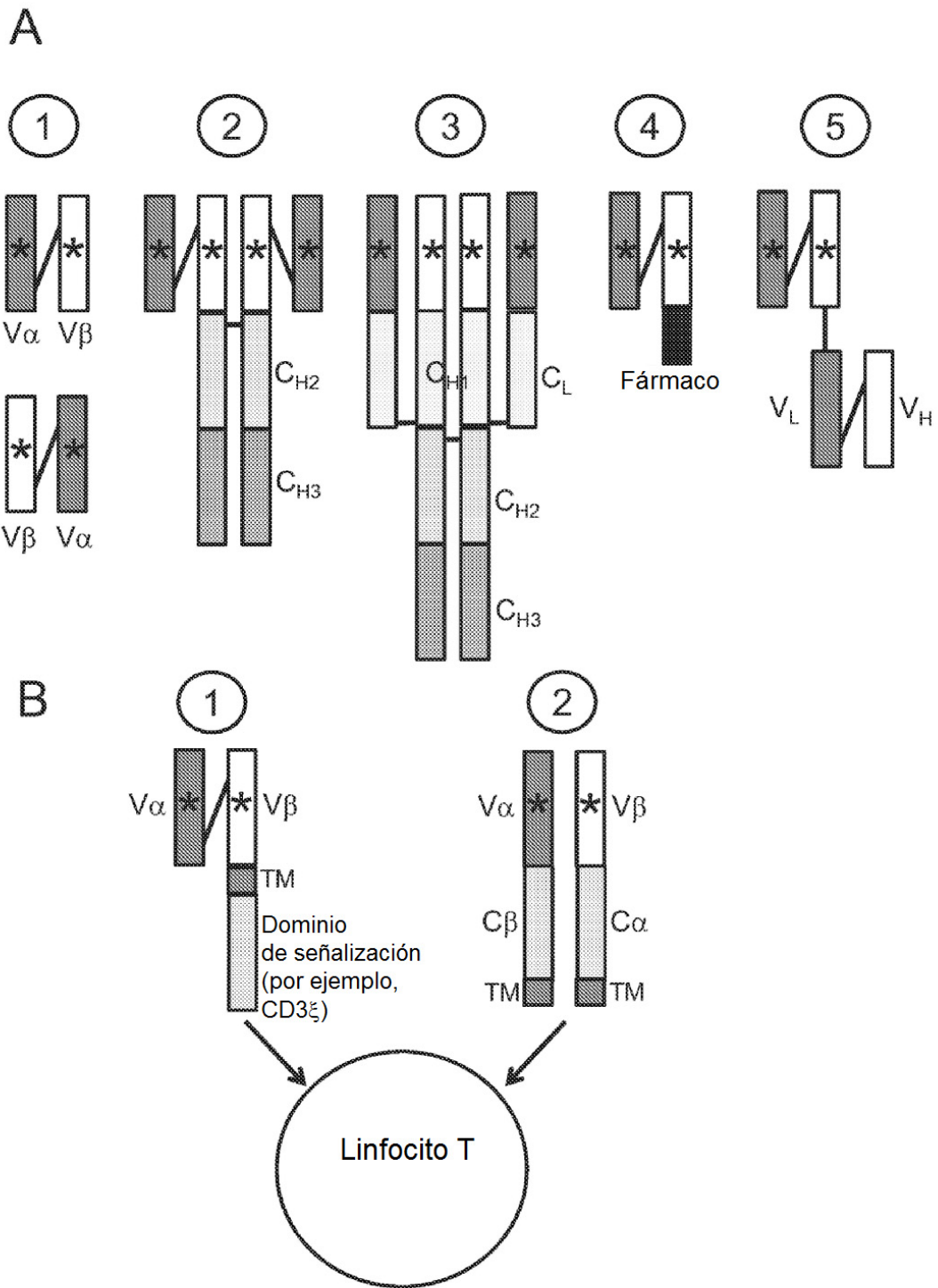


FIG. 12