

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 190**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/GB2014/052199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14748262 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3024468**

54 Título: **Receptores de linfocitos T**

30 Prioridad:

**26.07.2013 GB 201313377**

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

**04.12.2019**

73 Titular/es:

**ADAPTIMMUNE LIMITED (100.0%)  
91 Park Drive, Milton Park  
Abingdon, OX 14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**MOLLOY, PETER y  
PUMPHREY, NICHOLAS JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 734 190 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

- 5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (RLC) que se unen al epítipo peptídico FMNKFIYEI (158-166) restringido por HLA-A2 derivado de  $\alpha$  Fetoproteína (AFP). Determinados RLC preferidos de la invención demuestran excelentes características de unión y perfiles de especificidad para este epítipo de AFP.
- 10 La AFP se expresa durante el desarrollo fetal y es el componente principal del suero fetal. Durante el desarrollo, la proteína se produce a niveles muy altos en el saco vitelino y en el hígado y después se reprime. La expresión de AFP se reactiva frecuentemente en el carcinoma hepatocelular (Butterfield et al. J Immunol., 2001, 15 de abril; 166 (8): 5300-8) y altos niveles de la proteína se utilizan como un marcador de diagnóstico para la enfermedad.
- 15 El carcinoma hepatocelular tiene uno de los índices de supervivencia a los 5 años más bajos de todos los tumores malignos en los Estados Unidos, la incidencia anual global es de 1,2 millones y es probable que aumente debido a la pandemia de hepatitis B y C. Normalmente el tratamiento implica cirugía, sin embargo, solo es beneficiosa si se lleva a cabo en las primeras etapas de la enfermedad. Por lo tanto se desean nuevos tratamientos.
- 20 Hay cuatro epítopos conocidos derivados de AFP: AFP158, AFP137, AFP325 y AFP542 (Butterfield et al. J Immunol., 2001, 15 de abril; 166 (8): 5300-8 y Butterfield et al. Cancer Res. 1999, 59: 3134-3142). El péptido FMNKFIYEI (SEQ ID NO: 1) de AFP158 restringido por HLA-A2, proporciona una diana adecuada para nuevas intervenciones inmunoterapéuticas; este péptido se procesa de modo natural y se ha eluido de líneas de carcinoma hepático HepG2 (HLA-A2 positivo) y detectado mediante espectrometría de masas (Butterfield et al. J Immunol., 2001, 15 de abril; 166 (8): 5300-8). Se han suscitado clones de linfocitos T contra AFP158 (y AFP137) (Pichard et al. J Immunother. abril del 2008; 31(3): 246-53). Sin embargo, no se han comunicado receptores de linfocitos T que reconozcan a este péptido.
- 25 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un receptor de linfocitos T (RLC) de origen no natural y/o purificado y/o modificado por ingeniería genética que tiene la propiedad de unirse al complejo FMNKFIYEI (SEC ID NO: 1) HLA-A2 y que comprende al menos un dominio variable de la cadena alfa de RLC y al menos un dominio variable de la cadena beta de RLC, comprendiendo el dominio variable de la cadena alfa de Q1 a H112 de la SEC ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15, y comprendiendo el dominio variable de la cadena beta de D1 a T112 de la SEQ ID NO: 3.
- 30 Los RLC se describen utilizando la nomenclatura *International Immunogenetics* (IMGT) de RLC y está relacionada con la base de datos pública de secuencias de RLC de IMGT. Los RLC alfa-beta heterodiméricos nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una región de diversidad corta entre las regiones variables y de unión, pero esta región de diversidad a menudo se considera como parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) integradas en una secuencia estructural, siendo una de ellas la región hipervariable denominada CDR3. Existen varios tipos de regiones de variables de cadena alfa ( $V\alpha$ ) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ( $V\beta$ ) que se distinguen por su estructura, por las secuencias de CDR1 y CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos  $V\alpha$  se denominan mediante un solo número TRAV. Por lo tanto, "TRAV21" define una región  $V\alpha$  de RLT que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, y una secuencia CDR3 definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva de RLC a RLC pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de RLC a RLC. De la misma manera, "TRBV5-1" define una región  $V\beta$  de RLC que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, pero solo con una secuencia CDR3 parcialmente definida.
- 35 Los RLC se describen utilizando la nomenclatura *International Immunogenetics* (IMGT) de RLC y está relacionada con la base de datos pública de secuencias de RLC de IMGT. Los RLC alfa-beta heterodiméricos nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una región de diversidad corta entre las regiones variables y de unión, pero esta región de diversidad a menudo se considera como parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) integradas en una secuencia estructural, siendo una de ellas la región hipervariable denominada CDR3. Existen varios tipos de regiones de variables de cadena alfa ( $V\alpha$ ) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ( $V\beta$ ) que se distinguen por su estructura, por las secuencias de CDR1 y CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos  $V\alpha$  se denominan mediante un solo número TRAV. Por lo tanto, "TRAV21" define una región  $V\alpha$  de RLT que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, y una secuencia CDR3 definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva de RLC a RLC pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de RLC a RLC. De la misma manera, "TRBV5-1" define una región  $V\beta$  de RLC que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, pero solo con una secuencia CDR3 parcialmente definida.
- 40 una de ellas la región hipervariable denominada CDR3. Existen varios tipos de regiones de variables de cadena alfa ( $V\alpha$ ) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ( $V\beta$ ) que se distinguen por su estructura, por las secuencias de CDR1 y CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos  $V\alpha$  se denominan mediante un solo número TRAV. Por lo tanto, "TRAV21" define una región  $V\alpha$  de RLT que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, y una secuencia CDR3 definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva de RLC a RLC pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de RLC a RLC. De la misma manera, "TRBV5-1" define una región  $V\beta$  de RLC que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, pero solo con una secuencia CDR3 parcialmente definida.
- 45 aminoácidos que se conserva de RLC a RLC pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de RLC a RLC. De la misma manera, "TRBV5-1" define una región  $V\beta$  de RLC que tiene una estructura y secuencias CDR1 y CDR2 únicas, pero solo con una secuencia CDR3 parcialmente definida.
- 50 Las regiones de unión de los RLC se definen de manera similar mediante la nomenclatura única TRAJ y TRBJ de IMGT, y las regiones constantes mediante la nomenclatura TRAC y TRBC de IMGT.
- 55 En la nomenclatura IMGT, a la región de diversidad de cadena beta se la denomina con la abreviatura TRBD, y, como se ha mencionado, las regiones TRBD/TRBJ concatenadas a menudo se consideran en conjunto como la región de unión.
- 60 Generalmente se considera que cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los RLC  $\alpha\beta$  tiene dos "dominios" o "regiones", en concreto, dominios/regiones variables y constantes. En este documento, los términos "dominio(s)" y "región(es)" se usan indistintamente. El dominio variable consta de una concatenación de región variable y región de unión. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, por lo tanto, la expresión "dominio variable alfa RLC" por lo tanto, se refiere a la concatenación de las regiones TRAV y TRAJ, y la expresión dominio constante alfa RLC se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia TRAC truncada en C-terminal. Del mismo modo, la expresión "dominio variable beta RLC" se refiere a la concatenación de regiones TRBV y TRBD/TRBJ, y el término dominio constante beta RLC se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia TRBC truncada C-terminal.
- 65 Las secuencias únicas definidas por la nomenclatura IMGT son muy conocidas y accesibles para quienes trabajan en el campo de los RLC. Por ejemplo, pueden encontrarse en la base de datos pública de IMGT. The "T cell Receptor

Factsbook", (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8, también desvela secuencias definidas por la nomenclatura IMGT, pero debido a su fecha de publicación y a la consiguiente demora, la información que contiene a veces ha de confirmarse por referencia a la base de datos IMGT.

5 Las SEQ ID NO: 2 y 3 son, respectivamente, las secuencias extracelulares de cadenas alfa y beta de lo que en este documento se denomina RLC de AFP "parental". El RLC de AFP parental tiene el siguiente uso de cadenas alfa y beta:

10 Cadena alfa: TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC (en la Figura 1 se muestra la secuencia extracelular de la cadena alfa del RLC de AFP parental (SEC ID NO: 2). Las CDR están definidas por los aminoácidos 27-32 (CDR1), 50-55 (CDR2) y 90-101 (CDR3) de la SEC ID NO: 2.

15 Cadena beta: TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2 (en la Figura 2 se muestra la secuencia extracelular de la cadena beta del RLC de AFP parental (SEC ID NO: 3). Las CDR están definidas por los aminoácidos 27-31 (CDR1), 49-54 (CDR2) y 92-102 (CDR3) de la SEC ID NO: 3.

20 (Tenga en cuenta que los términos '\*01' y '\*02' indican que, para esta secuencia, hay más de una variante alélica, según lo designado por la nomenclatura IMGT, y que es la variante '\*01/\*02' que está presente en el clon RLC mencionado anteriormente. Tenga en cuenta también que la ausencia de un modificador "\*" significa que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante.)

25 Con el fin de proporcionar un RLC de referencia con el que se pueda comparar el perfil de unión de los RLC mutados de la invención, es conveniente usar el RLC soluble que tiene la secuencia extracelular de la cadena alfa RLC de AFP mostrada en la Figura 3 (SEC ID NO: 4) y la secuencia extracelular de la cadena beta RLC de AFP mostrada en la Figura 4 (SEC ID NO: 5). En este documento, a este RLC se le denomina "el RLC de referencia" o "el RLC de AFP de referencia". Tenga en cuenta que la SEQ ID NO: 4 es idéntica a la secuencia extracelular de cadena alfa parental SEQ ID NO: 2, excepto que C159 se ha sustituido por T159 (es decir, T48 de TRAC). Del mismo modo la SEQ ID NO: 5 es idéntica a la secuencia extracelular de cadena beta parental SEQ ID NO: 3, excepto que C169 se ha sustituido por S169 (es decir, S57 de TRBC2), A187 se ha sustituido por C187 y D201 se ha sustituido por N201. Estas sustituciones de cisteína, en relación con las secuencias extracelulares de las cadenas alfa y beta de AFP parental, permiten la formación de un enlace disulfuro entre cadenas que estabiliza al RLC soluble replegado, es decir, el RLC formado por replegamiento de cadenas alfa y beta extracelulares. El uso de RLC soluble, estable, ligado por enlace disulfuro, como el RLC de referencia, permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y de semivida de unión.

35 Los RLC de la invención pueden transformarse en linfocitos T, hacerlos capaces de destruir células que presentan el complejo AFP HLA-A2, para su administración a un paciente en el procedimiento de tratamiento conocido como terapia adoptiva. Para este fin, sería deseable que los RLC tuvieran una afinidad más alta y/o una constante de disociación más lenta para el complejo péptido-HLA que los RLC nativos específicos para ese complejo. Los aumentos drásticos en la afinidad se han asociado con una pérdida de especificidad antigénica en los linfocitos T CD8 modificados con el gen de RLC, lo que podría dar como resultado la activación inespecífica de estos linfocitos CD8 transfectados con RLC. Por lo tanto, los RLC que tienen una afinidad algo más alta y/o una constante de disociación más lenta para el complejo péptido-HLA que los RLC nativos específicos para ese complejo, pero no una afinidad drásticamente más alta y/o una disociación drásticamente más lenta para el complejo péptido-HLA que los RLC nativos, serían preferibles para la terapia adoptiva (véase Zhao et al., (2007) J Immunol. 179: 5845-54; Robbins et al., (2008) J Immunol. 180: 6116-31; y el documento WO2008/038002).

50 Los RLC de la invención están mutados con respecto al RLC de AFP parental. Las mutaciones pueden llevarse a cabo utilizando cualquier método apropiado, incluyendo, pero sin limitación, los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), procedimientos de clonación basados en enzimas de restricción o de clonación independiente de ligamiento (CIL). Estos métodos se detallan en muchos de los textos de biología molecular habituales. Para más detalles sobre la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sobre la clonación basada en enzimas de restricción, véase Sambrook y Russell, (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª Ed.) CSHL Press. En Rashtchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6(1): 30-6, puede encontrarse más información sobre procedimientos de clonación independiente de ligamiento (CIL).

55 También están dentro del alcance de la invención variantes fenotípicamente silenciosas de cualquier RLC desvelado en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "variantes fenotípicamente silenciosas" se entiende que se refiere a aquellos RLC que tienen una  $K_D$  y/o semivida de unión para el complejo FMNKFIYEI (SEQ ID NO: 1) HLA-A2 dentro de los intervalos de los valores de  $K_D$  y de semivida de unión descritos más adelante. Por ejemplo, como saben los expertos en la materia, puede ser posible producir RLC que incorporen cambios en los dominios constante y/o variable de los mismos en comparación con los detallados anteriormente sin alterar la afinidad por la interacción con el complejo FMNKFIYEI (SEQ ID NO: 1) HLA-A2. Dichas variantes triviales están incluidas en el alcance de esta invención. Aquellos RLC en los que se han realizado una o más sustituciones conservativas también forman parte de esta invención.

65 Como será obvio para los expertos en la materia, puede ser posible truncar las secuencias proporcionadas en el

extremo C y/o en el extremo N de las mismas, en 1, 2, 3, 4, 5 o más restos, sin que afecte sustancialmente a las características de unión del RLC. La presente invención abarca todas estas variantes triviales.

5 Los RLC nativos existen en formas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  heterodiméricas. Sin embargo, se ha demostrado anteriormente que los RLC recombinantes que constan de homodímeros  $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$  se unen a moléculas peptídicas del MHC (*major histocompatibility complex*, complejo principal de histocompatibilidad). Por lo tanto, el RLC de la invención puede ser un RLC  $\alpha\beta$  heterodimérico o puede ser un RLC  $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$  homodimérico.

10 Para su uso en terapia adoptiva, un RLC  $\alpha\beta$  heterodimérico puede, por ejemplo, transfectarse como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplasmáticos como transmembrana. En determinadas realizaciones, los RLC de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido entre los restos de los dominios constantes respectivos, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2006/000830.

15 Los RLC de la invención, particularmente los RLC alfa-beta heterodiméricos, pueden comprender una secuencia de dominio constante TRAC de cadena alfa y/o una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 de cadena beta. Las secuencias de dominio constante de las cadenas alfa y beta pueden modificarse mediante truncamiento o sustitución para eliminar el enlace disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2. La(s) secuencia(s) del dominio constante de la cadena alfa y/o beta también puede(n) modificarse mediante la sustitución de restos de cisteína por Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2, formando dichas cisteínas un  
20 enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del RLC.

25 Los RLC de la invención pueden estar en formato de una sola cadena, por ejemplo, véase el documento WO 2004/033685. Los formatos de una sola cadena incluyen polipéptidos de RLC  $\alpha\beta$  de los tipos  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ , en donde  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, del RLT,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, del RLC y L es una secuencia enlazadora. En determinadas realizaciones, los RLC de cadena única de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido entre los restos de los dominios constantes respectivos, como se describe en el documento WO 2004/033685.

30 Los RLC de la invención tienen la propiedad de unirse al complejo FMNKFIYEI (SEQ ID NO: 1) HLA-A2. Se ha descubierto que determinados RLC de la invención son muy adecuados para su uso en terapia adoptiva. Dichos RLC pueden tener una  $K_D$  para el complejo menor que la del RLC de AFP parental, por ejemplo, de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 21  $\mu$ M y/o tener una semivida ( $T_{1/2}$ ) de unión para el complejo en el intervalo de menos de 0,5 segundos a aproximadamente 2 segundos. El aumento de la afinidad de unión de un RLC nativo a menudo reduce la selectividad del RLC por su ligando peptídico con el MHC, y esto se demuestra en Zhao Yangbing et al., (J. Immunol, 2007 179: 9, p5845-5854). Sin embargo, determinados RLC de la invención siguen siendo selectivos para el complejo FMNKFIYEI HLA-A2, a pesar de que, en algunas realizaciones, tengan mayor afinidad de unión que el RLC de AFP parental (véase el Ejemplo 6).

40 La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio  $K_D$ ) y la semivida de unión (expresada como  $T_{1/2}$ ) pueden determinarse mediante cualquier método apropiado. Se apreciará que, al duplicar la afinidad de un RLC, la  $K_D$  se reduce a la mitad.  $T_{1/2}$  se calcula como  $\ln 2$  dividido entre la constante de disociación ( $k_{off}$ ). Por lo tanto, duplicando los resultados de  $T_{1/2}$  los valores de  $k_{off}$  se reducen a la mitad. Los valores de  $K_D$  y  $k_{off}$  de los RLT generalmente se miden para formas solubles del TCR, es decir, aquellas formas que se truncan para eliminar restos del dominio citoplasmático y transmembrana. Por lo tanto, debe entenderse que un RLC dado tiene una afinidad de  
45 unión y/o una semivida de unión mejoradas para el RLC parental, si una forma soluble de ese RLC tiene dichas características. Preferentemente, la afinidad de unión o la semivida de unión de un RLC dado se mide varias veces, por ejemplo 3 veces o más, utilizando el mismo protocolo de ensayo, y se toma un promedio de los resultados. En una realización preferida, estas mediciones se realizan utilizando el método de Resonancia de Plasmón Superficial (BIAcore) del Ejemplo 3 del presente documento.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico de origen no natural y/o purificado y/o modificado por ingeniería genética que codifica un RLC de la invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADNc. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena  $\alpha$  de un RLC de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona  
55 ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena  $\beta$  de un RLC de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica tanto un dominio variable de cadena  $\alpha$  de un RLC de la invención como un dominio variable de cadena  $\beta$  de un RLC de la invención.

60 En el presente documento se desvela un vector que comprende ácido nucleico de la invención. Preferentemente, el vector es un vector de expresión de RLC.

65 La invención también proporciona una célula que contiene (a) un vector de expresión de RLC que comprende ácido nucleico de la invención que codifica en un solo marco abierto de lectura, o en dos marcos abiertos de lectura distintos, la cadena alfa y la cadena beta respectivamente o (b) un primer vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa de un RLC de la invención, y un segundo vector de expresión que comprende ácido nucleico

que codifica la cadena beta de un RLC de la invención. Dichas células son particularmente útiles en terapia adoptiva. Las células pueden ser células aisladas y/o recombinantes y/o de origen no natural y/o estar modificadas por ingeniería genética.

5 Dado que los RLC de la invención tienen utilidad en terapia adoptiva, la invención incluye una célula de origen no natural y/o purificada y/o modificada por ingeniería genética, especialmente un linfocito T, que presenta un RLC de la invención. Existen diversos métodos adecuados para la transfección de linfocitos T con ácido nucleico (tal como ADN, ADNc o ARN) que codifica los RLC de la invención (véase, por ejemplo, Robbins et al., (2008) J Immunol. 180: 6116-6131). Los linfocitos T que expresan los RLC de la invención serán adecuadas para su uso en el tratamiento basado  
10 en terapia adoptiva de cánceres tales como los del páncreas y el hígado. Como sabrán los expertos en la materia, hay diversos métodos adecuados mediante los cuales se puede llevar a cabo una terapia adoptiva (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., (2008) Nat Rev Cancer 8 (4): 299-308).

15 Como se sabe bien en la técnica, los RLC de la invención pueden someterse a modificaciones postraduccionales cuando se expresan por células transfectadas. La glucosilación es una de dichas modificaciones, que comprende la unión covalente de grupos oligosacáridicos con aminoácidos definidos en la cadena del RLC. Por ejemplo, los restos de asparagina o los restos de serina/treonina son lugares bien conocidos para la unión de oligosacáridos. El estado de glucosilación de una proteína en particular depende de diversos factores, incluyendo la secuencia de proteínas, la conformación de proteínas y la disponibilidad de determinadas enzimas. Adicionalmente, el estado de glucosilación  
20 (es decir, el tipo de oligosacárido, el enlace covalente y el número total de uniones) puede influir en la función de la proteína. Por lo tanto, cuando se producen proteínas recombinantes, controlar la glucosilación es a menudo deseable. La glucosilación de los RLC transfectados puede controlarse mediante mutaciones del gen transfectado (Kuball J et al. (2009), J Exp Med 206 (2): 463-475). Dichas mutaciones también se incluyen en esta invención.

25 El RLC de la invención puede estar asociado con un marcador detectable, un agente terapéutico o un grupo modificador de PK.

Determinados RLC de la invención pueden estar en forma soluble (es decir, no tienen dominios transmembrana o citoplasmáticos). Para la estabilidad, los RLC de la invención, y preferentemente los RLC heterodiméricos  $\alpha\beta$  solubles,  
30 pueden tener un enlace disulfuro introducido entre los restos de los dominios constantes respectivos, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Algunos RLC solubles de la invención son útiles para preparar proteínas de fusión que pueden usarse para suministrar marcadores detectables o agentes terapéuticos a células presentadoras de antígeno y a tejidos que contienen células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, pueden asociarse  
35 (de manera covalente o de otra manera) con un marcador detectable (con fines de diagnóstico en donde el RLC se utiliza para detectar la presencia de células que presentan el complejo FMNKFIYEI (SEQ ID NO 1) HLA-A2; un agente terapéutico; o un grupo modificador de PK (por ejemplo, por PEGilación).

40 Como marcadores detectables con fines de diagnóstico se incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste.

Los agentes terapéuticos que pueden estar asociados con los RLC de la invención incluyen inmunomoduladores, compuestos radiactivos, enzimas (por ejemplo, perforina) o agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejercen en el lugar deseado, la toxina podría estar dentro de un liposoma unida a un RLC, de manera que el compuesto se libere lentamente. Esto evitará los efectos dañinos durante el transporte  
45 en el cuerpo y garantizará que la toxina tenga un efecto máximo después de la unión del RLC con las células presentadoras de antígeno pertinentes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- 50
- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de destruir células de mamífero que tienen un peso molecular inferior a 700 Daltons. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos que pueden tener un efecto citotóxico. Adicionalmente, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que, en condiciones fisiológicas, se degradan o se transforman para liberar agentes citotóxicos. Como ejemplos de dichos agentes se incluyen cisplatino, derivados  
55 de maitansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, porfímero de sodio, fotofrina II, temozolomida, topotecán, glucuronato de trimetrexato, auristatina E, vincristina y doxorubicina;
  - citotoxinas peptídicas, es decir, proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de destruir células de mamífero. Por ejemplo, ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de *Pseudomonas*, ADNasa y ARNasa;
  - 60 • radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se degradan con la emisión simultánea de una o más de las partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ . Por ejemplo, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astatina 213; pueden utilizarse agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos con los RLC de alta afinidad, o con múltiplos de los mismos;
  - inmunoestimulantes, es decir, moléculas inmunofectoras que estimulan la respuesta inmunitaria. Por ejemplo,  
65 citocinas tales como IL-2 e IFN- $\gamma$ ,
  - Superantígenos y mutantes de los mismos;

- Fusiones RLC-HLA;
  - quimiocinas, tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanomas, etc;
  - anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluidos los anticuerpos determinantes anti-linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales (células NK, del inglés *Natural Killer*) (por ejemplo, anti-CD3, anti-CD28 o anti-CD16));
- 5
- armazones proteicos alternativos con características de unión similares a las de los anticuerpos
  - activadores del complemento;
  - dominios proteicos xenogénicos, dominios proteicos alogénicos, dominios de proteínas víricas/bacterianas, péptidos víricos/bacterianos.

10 Para la administración a pacientes, los RLC o las células de la invención, pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las células de acuerdo con la invención se suministrarán generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del método de administración que se desee realizar a un paciente). Esta puede proporcionarse en una forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionará en un recipiente sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente incluiría (aunque no necesariamente) las instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

15

La composición farmacéutica puede adaptarse para su administración por cualquier vía apropiada, preferentemente por una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o preferentemente intravenosa). Dichas composiciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con el vehículo (o vehículos) o excipiente (o excipientes) en condiciones estériles.

20

Los RLC, las composiciones farmacéuticas, los vectores, los ácidos nucleicos y las células de la invención pueden proporcionarse en forma sustancialmente pura, por ejemplo al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de pureza.

25

La invención también proporciona un RLC de la invención, o una célula de la invención, para su uso en medicina, preferentemente en un método de tratamiento del cáncer. El método puede comprender terapia adoptiva;

30

- Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos con los cambios debidos. Cualquier referencia o identificación de cualquier documento en esta solicitud, no debería interpretarse como una admisión de que dicho documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.
- 35

#### Descripción de las figuras

La figura 1 (SEQ ID NO: 2) proporciona la secuencia de aminoácidos de la parte extracelular de la cadena alfa del RLC específico de AFP parental con el uso génico TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC.

40

La figura 2 (SEQ ID NO: 3) proporciona la secuencia de aminoácidos de la parte extracelular de la cadena beta del RLC específico de AFP parental con el uso génico TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2.

La figura 3 (SEQ ID NO: 4) proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de un RLC soluble (denominado en este documento "RLC de referencia"). La secuencia es la misma que la de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) excepto que una cisteína (en negrita y subrayada) se sustituye por T159 de la SEC ID NO: 2 (es decir, T48 de la región constante de TRAC).

45

La figura 4 (SEQ ID NO: 5) proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de un RLC soluble (denominado en este documento "RLC de referencia"). La secuencia es la misma que la de la Figura 2 (SEQ ID NO: 3) excepto que una cisteína (en negrita y subrayada) se sustituye por S169 de la SEC ID NO: 3 (es decir, S57 de la región constante de TRBC2) y A187 se sustituye por C187 y D201 se sustituye por N201.

50

La figura 5 (SEQ ID NO: 6-20) proporciona la secuencia de aminoácidos de las cadenas alfa mutadas que pueden estar presentes en los RLC de la invención. Las regiones CDR están subrayadas y los cambios de aminoácidos en relación con el RLC de AFP parental están sombreados.

55

La figura 6 (SEQ ID NO: 21) y (SEQ ID NO: 22) proporciona las secuencias de ADN que codifican las cadenas alfa y beta del RLC mostradas en las Figuras 3 y 4 respectivamente

60

La figura 7 (SEQ ID NO: 23) proporciona la secuencia de ADN del gen del RLC de AFP parental (construcción de cadena alfa-2A-cadena beta con la secuencia 2A de teschovirus-1 porcino en negrita y subrayada) para la transducción de linfocitos T.

La figura 8 (SEQ ID NO: 24) proporciona la secuencia de aminoácidos del RLC de AFP parental para la transducción de linfocitos T producida a partir de la secuencia de ADN de la Figura 7. La secuencia 2A de

65

teschovirus-1 porcino se indica en negrita y subrayada.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo ELISPOT en el que se evaluó la liberación de IFN- $\gamma$  de linfocitos T transducidos con el RLC de AFP en respuesta a una serie de células diana

5 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### 10 Ejemplo 1

Clonación de las secuencias de la región variable de la cadena alfa y beta del RLC de AFP parental en plásmidos de expresión basados en pGMT7

15 Los dominios alfa variable del RLC y beta variable del RLC de AFP de referencia, se amplificaron por PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de linfocitos T de AFP. En el caso de la cadena alfa, para amplificar el dominio variable de la cadena alfa, se utilizó una secuencia de la región variable de la cadena alfa específica del oligonucleótido A1 gaattccatgcaaaaagaagtgaacaaaattctggaccctc (SEQ ID NO: 25) que codifica el sitio de restricción NdeI y una secuencia de la región constante de la cadena alfa específica del oligonucleótido A2 ttgtcagtcgacttagagtctctcagctgttacacg (SEQ ID NO: 26) que codifica el sitio de restricción Sall. En el caso de la cadena beta, para amplificar el dominio variable de la cadena beta se utilizó una secuencia de la región variable de la cadena beta específica del oligonucleótido B1 gaattccatggtgattctggagttacacaaaaccccaaagcacctg (SEQ ID NO: 27) que codifica el sitio de restricción NdeI y secuencia de la región constante de la cadena beta específica del oligonucleótido B2 tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc (SEQ ID NO: 28) que codifica el sitio de restricción AgeI.

25 Mediante métodos habituales descritos en (Molecular Cloning a Laboratory Manual, tercera edición, de Sambrook y Russell), los dominios variables alfa y beta se clonaron en plásmidos de expresión basados en pGMT7 que contenían C $\alpha$  o C $\beta$ . Los plásmidos se secuenciaron utilizando un analizador de ADN de Applied Biosystems 3730xl.

30 Las secuencias de ADN que codificaban la cadena alfa del RLC cortadas con *NdeI* y *Sall* se ligaron en el vector pGMT7 + C $\alpha$ , que se cortó con *NdeI* y *XhoI*. Las secuencias de ADN que codificaban la cadena beta del RLC cortadas con *NdeI* y *AgeI* se ligaron en un vector pGMT7 + C $\beta$  distinto, que también se cortó con *NdeI* y *AgeI*.

#### Ligamiento

35 Los plásmidos ligados se transformaron en células competentes de *E. coli* de la cepa XL1-blue y se sembraron en placas de LB/agar que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Después de la incubación durante una noche a 37 °C, se tomaron colonias individuales y se cultivaron durante una noche en LB 10 ml que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml a una temperatura de 37 °C con agitación. Los plásmidos clonados se purificaron utilizando un kit Miniprep (Qiagen) y los plásmidos se secuenciaron utilizando un analizador de ADN de Applied Biosystems 3730xl.

45 Las Figuras 3 y 4 muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RLC de AFP de referencia (SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente) producidas a partir de las secuencias de ADN de la figura 7 (SEQ ID NO: 21) (SEQ ID NO: 22) respectivamente. Cabe destacar que, en relación con el RLC parental, para formar el RLC heterodimérico, las cisteínas se sustituyeron en las regiones constantes de las cadenas alfa y beta para proporcionar un enlace disulfuro artificial entre cadenas en el repliegamiento. Las cisteínas introducidas se muestran en negrita y subrayadas.

#### Ejemplo 2

50 Expresión, repliegamiento y purificación del RLC de AFP parental soluble

Los plásmidos de expresión que contenían la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$ , respectivamente, del RLC, como los preparados en el Ejemplo 1, se transformaron por separado en la cepa BL21pLysS de *E. coli* y antes de inducir la expresión de las proteínas con IPTG 0,5 mM, se cultivaron colonias únicas resistentes a ampicilina a una temperatura de 37 °C en medio TYP (ampicilina 100  $\mu$ g/ml) a una DO<sub>600</sub> de ~ 0,6-0,8. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron mediante centrifugación durante 30 minutos a 4 000 rpm en una centrífuga Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con Bug Buster® 25 ml (Novagen) en presencia de MgCl<sub>2</sub> y DNaseI. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13 000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21.

60 Después, se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y los componentes de la membrana. El sedimento de los cuerpos de inclusión se homogeneizaba cada vez en un tampón de Tritón (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Tritón-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de sedimentarlo por centrifugación durante 15 minutos a 13 000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se eliminó el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento proteico de los cuerpos de inclusión se

cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 se realizó una medición de la DO. Después, la concentración proteica se calculó utilizando el coeficiente de extinción.

5 Aproximadamente 15 mg de cadena  $\beta$  de RLC y 15 mg de cuerpos de inclusión solubilizados en cadena  $\alpha$  de RLC se descongelaron de reservas congeladas y se diluyeron en 10 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM, pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 10 mM), para garantizar la desnaturalización completa de la cadena. Después, la solución de guanidina que contenía las cadenas de RLC completamente reducidas y desnaturalizadas, se inyectó en 0,5 litros del siguiente tampón de replegamiento: Tris 100 mM, pH 8,1, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. El par redox (clorhidrato de cisteamina y diclorhidrato de cistamina) a concentraciones  
10 finales de 6,6 mM y 3,7 mM respectivamente, se añadió aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de RLC desnaturalizadas. La solución se dejó durante -30 minutos. El RLC replegado se dializó en una membrana Spectra/Por® 1 (Spectrum; N.º de Producto 132670) frente a 10 l de H<sub>2</sub>O durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió a Tris 10 mM recién preparado, pH 8,1 (10 l) y la diálisis continuó a una temperatura de 5 °C  $\pm$  3 °C durante 8 horas aproximadamente.

15 El RLC soluble se separó de los productos de degradación e impurezas cargando el replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM, pH 8,1 en 50 volúmenes de columna utilizando un purificador Akta® (GE Healthcare). Las fracciones pico se agruparon y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem). Después, las fracciones pico agrupadas se conservaron a 4 °C y se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie antes de agruparlas y concentrarlas. Finalmente, el RLC soluble se purificó y se caracterizó utilizando una columna de filtración en gel Superdex® 75HR de GE Healthcare previamente equilibrada en tampón PBS (Sigma). El pico de elución a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se agrupó y se concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón superficial BIAcore®.

25 Ejemplo 3

Caracterización de unión

30 *Análisis BIAcore*

Para analizar la unión de un RLC soluble con su ligando péptido-MHC, puede utilizarse un biodetector de resonancia de plasmón superficial (BIAcore® 3000). Esto es posible produciendo complejos de péptido biotinilado soluble-HLA ("pHLA") que pueden inmovilizarse en una superficie de unión revestida con estreptavidina (micoplaca detectora). Las  
35 microplacas detectoras comprenden cuatro células de flujo individuales que permiten la medición simultánea de la unión del receptor de linfocitos T a cuatro complejos de pHLA diferentes. La inyección manual del complejo pHLA permite manipular fácilmente el nivel exacto de moléculas de clase I inmovilizadas.

40 Las moléculas de HLA-A\*02 de clase I biotiniladas se replegaron *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión expresados en bacterias que contenían las proteínas de la subunidad constituyente y el péptido sintético, seguido de purificación y biotinilación enzimática *in vitro* (O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). La cadena pesada-HLA-A\*02 se expresó con una etiqueta de biotinilación C-terminal que reemplazaba los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en una construcción apropiada. Se obtuvieron niveles de expresión de cuerpos de inclusión de ~ 75 mg/litro de cultivo bacteriano. La cadena ligera de MHC, o microglobulina  $\beta$ 2, también se expresó como cuerpos  
45 de inclusión en *E. coli* a partir de una construcción apropiada, a un nivel de ~500 mg/litro de cultivo bacteriano.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purificaron hasta obtener una pureza de aproximadamente 80 %. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturalizó en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, y se replegó a una concentración de 30 mg/litro de cadena pesada,  $\beta$ 2m  
50 30 mg/litro en L-Arginina 0,4 M, Tris 100 mM pH 8,1, diclorhidrato de cistamina 3,7 mM, clorhidrato de cisteamina 6,6 mM, 4 mg/l del péptido AFP necesario para ser cargado por la molécula HLA-A\*02, por adición de un solo pulso de proteína desnaturalizada en un tampón de replegado a <5 °C. Se dejó acabar el replegamiento a 4 °C durante al menos 1 hora.

55 El tampón se cambió por diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM, pH 8,1. La solución de proteína se filtró después a través de un filtro de acetato de celulosa de 1,5  $\mu$ m y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ (8 ml de volumen de lecho). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM, pH 8,1, utilizando un purificador Akta® (GE Healthcare). El complejo HLA-A\*02-péptido se eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM y se recogieron las fracciones pico, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.  
60

Se les cambió el tampón a las moléculas de pHLA etiquetadas con biotinilación a tampón Tris 10 mM, pH 8,1, NaCl 5 mM utilizando una columna de desalinización rápida de Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteína se enfriaron en hielo y se añadió cóctel inhibidor de proteasa (Calbiochem). Después se añadieron los reactivos de biotinilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8), MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM y enzima BirA 5  $\mu$ g/ml (purificada según O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15).  
65



Después, la mezcla de reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante una noche.

Las moléculas de pHLA-A\*01 biotiniladas se purificaron utilizando cromatografía por filtración en gel. Una columna GE Healthcare Superdex® 75 HR 10/30 se equilibró previamente con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción de biotinilación y la columna se desarrolló con PBS a 0,5 ml/min utilizando un purificador Akta® (GE Healthcare). Las moléculas de pHLA-A\*02 biotiniladas eluyeron como un solo pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se agruparon, se enfriaron en hielo y se añadió cóctel inhibidor de proteasa. La concentración proteica se determinó utilizando un ensayo de unión de Coomassie (PerBio) y las alícuotas de las moléculas de pHLA-A\*02 biotiniladas se conservaron congeladas a -20 °C.

El biodetector de resonancia de plasmón superficial (RPS) BIAcore® 3000 mide cambios en el índice de refracción expresados en unidades de respuesta (UR) cerca de una superficie detectora dentro de una célula de flujo pequeño, un principio que puede utilizarse para detectar las interacciones de los ligandos con receptores y para analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Los experimentos BIAcore® se realizaron a una temperatura de 25 °C, utilizando tampón PBS (Sigma, pH 7,1-7,5) como tampón de ejecución y en la preparación de diluciones de muestras de proteínas. La estreptavidina se inmovilizó en las células de flujo mediante métodos habituales de acoplamiento de aminas. Los complejos de pHLA se inmovilizaron a través de la etiqueta de biotina. Después, el ensayo se realizó pasando el RLC soluble sobre las superficies de las distintas células de flujo a un caudal constante, midiendo la respuesta de RPS al hacerlo.

#### *Constante de unión en equilibrio*

Los métodos de análisis BIAcore® anteriores se utilizaron para determinar las constantes de unión en equilibrio. Se prepararon diluciones en serie de la forma heterodimérica soluble unida por disulfuro del RLC de AFP de referencia y se inyectaron a un caudal constante de 5  $\mu\text{l min}^{-1}$  sobre dos células de flujo diferentes; una revestida con -1000 UR de complejo HLA-A\*02 específico, la segunda revestida con -1000 UR de complejo HLA-A2-péptido inespecífico. La respuesta se normalizó para cada concentración utilizando la medición de la célula de control. Los datos de respuesta normalizados se representaron gráficamente frente a la concentración de muestras de RLC y se ajustaron a un modelo de ajuste de curva no lineal para calcular la constante de unión en equilibrio,  $K_D$  (Price y Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª edición) 1979, Clarendon Press, Oxford). La forma soluble unida por disulfuro del RLC de la AFP de referencia (Ejemplo 2) demostró una  $K_D$  de aproximadamente 754  $\mu\text{M}$ . A partir de los mismos datos de BIAcore®, la  $T_{1/2}$  fue aproximadamente <0,5 s.

#### *Parámetros cinéticos*

Los métodos de análisis BIAcore® anteriores también se utilizaron para determinar las constantes de unión en equilibrio y las constantes de disociación.

Para los RLC de alta afinidad (véase el Ejemplo 4 a continuación) la  $K_D$  se determinó midiendo experimentalmente la constante de velocidad de disociación,  $k_{\text{off}}$  y la constante de velocidad de asociación,  $k_{\text{on}}$ . La constante de equilibrio  $K_D$  se calculó como  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ .

El RLC se inyectó en dos células diferentes, una revestida con -1000 RU del complejo FMNKFYIEI HLA-A\*02, y la segunda revestida con -1000 UR del complejo HLA-A2-péptido inespecífico. El caudal se fijó a 50  $\mu\text{l/min}$ . Normalmente, se inyectaron 250  $\mu\text{l}$  de RLC a una concentración de  $\sim 1 \mu\text{M}$ . Después, el tampón se desbordó hasta que la respuesta volvió a la línea de referencia o transcurrieron más de 2 horas. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el programa informático BIAevaluation®. La fase de disociación se ajustó a una sola ecuación de degradación exponencial, lo que permitió realizar el cálculo de la semivida.

#### Ejemplo 4

##### Preparación de los RLC mutados de la invención

La presentación en fagos es un medio mediante el cual pueden generarse bibliotecas de variantes de RLC para identificar mutantes de mayor afinidad. La presentación en fagos del RLC y los métodos de exploración descritos en (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) se aplicaron al RLC de AFP parental del Ejemplo 1.

Se identificaron RLC con unión mejorada en comparación con el RLC de AFP parental, que tenían una o más mutaciones en los restos de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa 31Q, 32S, 94D, 95S, 96G, 97Y y 98A (utilizando la numeración mostrada en la SEC ID NO: 2). En la Figura 5 se muestran ejemplos específicos de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas alfa (SEQ ID NO: 6 a 20) de los RLC de mayor afinidad. Estas cadenas alfa están mutadas en la CDR1 y/o la CDR3.

Los plásmidos de expresión que contenían la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$ , respectivamente, del RLC, para los siguientes RLC de la invención, se prepararon como en el Ejemplo 1:

ID RLC	Cadena alfa SEQ ID NO	Cadena Beta SEQ ID NO
Parental	2	3
ADB327	6	3
ADB329	7	3
ADB330	8	3
ADB331	9	3
ADB328	10	3
ADB352	11	3
ADB350	12	3
ADB332	13	3
ADB351	14	3
ADB349	15	3
ADB353	16	3
ADB326	17	3
ADB333	18	3
ADB334	19	3
ADB335	20	3

Los plásmidos se transformaron por separado en la cepa BL21pLysS de *E. coli* y antes de inducir la expresión de las proteínas con IPTG 0,5 mM, se cultivaron colonias únicas resistentes a ampicilina a una temperatura de 37 °C en medio TYP (ampicilina 100 µg/ml) a una DO<sub>600</sub> de ~ 0,6-0,8. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron mediante centrifugación durante 30 minutos a 4 000 rpm en una centrífuga Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con Bug Buster® 25 ml (Novagen) en presencia de MgCl<sub>2</sub> y DNasal. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13 000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después, se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y los componentes de la membrana. El sedimento de los cuerpos de inclusión se homogeneizaba cada vez en un tampón de Tritón (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Tritón-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de sedimentarlo por centrifugación durante 15 minutos a 13 000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se eliminó el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento proteico de los cuerpos de inclusión se cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 se realizó una medición de la DO. Después, la concentración proteica se calculó utilizando el coeficiente de extinción.

Aproximadamente 10 mg de cadena β de RLC y 10 mg de cuerpos de inclusión solubilizados de cadena α de RLC para cada RLC de la invención, se diluyeron en 10 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM, pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 10 mM), para garantizar la desnaturalización completa de la cadena. Después, la solución de guanidina que contenía las cadenas de RLC completamente reducidas y desnaturalizadas, se inyectó en 0,5 litros del siguiente tampón de plegamiento: Tris 100 mM, pH 8,1, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. El par redox (clorhidrato de cisteamina y diclorhidrato de cistamina) a concentraciones finales de 6,6 mM y 3,7 mM respectivamente, se añadió aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de RLC desnaturalizadas. La solución se dejó durante -30 minutos. El RLC plegado se dializó en 1 membrana Spectra/Por® (Spectrum; N.º de Producto 132670) frente a 10 l de H<sub>2</sub>O durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió a Tris 10 mM recién preparado, pH 8,1 (10 l) y la diálisis continuó a una temperatura de 5 °C ± 3 °C durante 8 horas aproximadamente.

El RLC soluble se separó de los productos de degradación e impurezas cargando el plegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM, pH 8,1 en 15 volúmenes de columna utilizando un purificador Akta® (GE Healthcare). Después, las fracciones pico agrupadas se conservaron a 4 °C y se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie antes de agruparlas y concentrarlas. Finalmente, los RLC solubles se purificaron y caracterizaron utilizando una columna de filtración en gel Superdex® 75HR de GE Healthcare pre-equilibrada en tampón PBS (Sigma). El pico de elución a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se agrupó y se concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón superficial BIAcore®.

Los perfiles de afinidad de los RLC preparados de este modo para el epítipo de AFP se evaluaron usando el método del Ejemplo 3 y se compararon con el RLC de referencia. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

dominio extracelular de cadena alfa de RLC	T <sub>1/2</sub> (s)	KD $\mu$ M
Parental	<0,5	754
ADB327	<0,5	489
ADB329	<0,5	356
ADB330	<0,5	178
ADB331	<0,5	79,5
ADB328	<0,5	33,3
ADB352	<0,5	20,1
ADB350	0,8	11,0
ADB332	0,7	10,6
ADB351	0,8	8,0
ADB349	1,8	4,55
ADB353	1,5	4,17
ADB326	1,5	1,50
ADB333	3,8	0,71
ADB334	4,3	0,52
ADB335	13,9	0,31

Ejemplo 5

5 Transfección de linfocitos T con RLC de AFP parentales y variantes

(a) Preparación de vector lentivírico mediante transfección transitoria mediada por Express-In de células 293T

10 Para empaquetar vectores lentivíricos que contienen el gen que codifica el RLC deseado, se utilizó un sistema de empaquetamiento lentivírico de 3<sup>a</sup> generación. Células 293T se transfectaron con 4 plásmidos (un vector lentivírico que contenía el gen de un solo ORF (marco abierto de lectura) de cadena alfa de RLC-P2A-cadena beta de RLC descrito en el Ejemplo 5c (más adelante), y 3 plásmidos que contenían los otros componentes necesarios para construir partículas lentivíricas infecciosas pero no replicativas) utilizando transfección mediada por Express-In (Open Biosystems).

15 Para la transfección se coge un matraz T150 de células 293T en fase de crecimiento exponencial, con las células distribuidas uniformemente en la placa, y a una confluencia ligeramente mayor del 50 %. Las alícuotas Express-In se llevan a temperatura ambiente. En un tubo cónico estéril de 15 ml se colocan 3 ml de medio sin suero (RPMI 1640 + HEPES 10 mM). Se añaden 174  $\mu$ l de reactivo Express-In directamente en el medio sin suero (esto da una proporción en peso de reactivo con respecto a ADN de 3,6: 1). Se mezcla exhaustivamente invirtiendo los tubos 3-4 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 5-20 minutos.

20 En un microtubo distinto de 1,5 ml, a las alícuotas de la mezcla de empaquetamiento premezcladas (que contienen 18  $\mu$ g de pRSV.REV (plásmido de expresión Rev) se añaden 15  $\mu$ g de ADN plasmídico, 18  $\mu$ g de pMDLg/p.RRE (plásmido de expresión Gag/Pol), 7  $\mu$ g de pVSV-G (plásmido de expresión de glicoproteína VSV), habitualmente ~ 22  $\mu$ l y se pipetea hacia arriba y hacia abajo para garantizar la homogeneidad de la mezcla de ADN. A la mezcla de ADN se la añade por goteo ~ 1 ml de Express-In/Medio sin suero y después se pipetea hacia arriba y hacia abajo suavemente antes de volver a transferir al resto del Express-In/ Medio sin suero. El tubo se invierte 3-4 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.

30 El medio de cultivo antiguo se retira del matraz de células. El complejo Express-In/medio/ADN (3 ml) se añade al matraz directamente en el fondo de un matraz vertical de células 293T. Lentamente, se coloca el matraz plano para cubrir las células y el matraz se balancea suavemente para garantizar una distribución uniforme. Después de 1 minuto, se añade 22 ml de medio de cultivo reciente (R10+HEPES: RPMI 1640, FBS termoinactivado al 10 %, Pen/Estrep/I-glutamina al 1 %, HEPES 10 mM) y cuidadosamente se lleva de nuevo a la incubadora. Se incuba durante la noche a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24 horas, se procede a recoger el medio que contiene los vectores lentivíricos empaquetados.

40 Para recoger los vectores lentivíricos empaquetados, el sobrenadante del cultivo celular se filtra a través de un filtro de jeringa de nailon de 0,45 micrómetros, se centrifuga el medio de cultivo a 10 000 g durante 18 horas (o a 112 000 g durante 2 horas), se elimina la mayor parte del sobrenadante (teniendo cuidado de no alterar el sedimento) y se resuspende el sedimento en los pocos ml restantes de sobrenadante (generalmente aproximadamente 2 ml de un volumen inicial de 31 ml por tubo). Alícuotas de 1 ml se congelan al instante y se conservan a -80 °C.

45 (b) Transducción de linfocitos T con vectores lentivíricos empaquetados que contienen un gen de interés

Antes de la transducción con los vectores lentivíricos empaquetados, se aíslan linfocitos T humanos (CD8 o CD4 o ambos según las necesidades) de la sangre de voluntarios sanos. Estas células se cuentan y se incuban durante la noche en R10 que contiene 50 U/ml de IL-2 a  $1 \times 10^6$  células por ml (0,5 ml/pocillo) en placas de 48 pocillos con microperlas revestidas con anticuerpo anti-CD3/CD28 prelavado (Dynabeads® expansoras de linfocitos T de Invitrogen) a una proporción de 3 perlas por célula.

Después de la estimulación durante la noche, a las células deseadas se añaden 0,5 ml de vector lentivírico empaquetado sin diluir. Se incuba durante 3 días a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Tres días después de la transducción se cuentan las células y se diluyen a  $0,5 \times 10^6$  células/ml. Se añade medio reciente que contenga IL-2 según sea necesario. Las perlas se retiran 5-7 días después de la transducción. Las células se cuentan y se reemplaza o se añade medio reciente que contenga IL-2 a intervalos de 2 días. Las células se mantienen entre  $0,5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células pueden analizarse mediante citometría de flujo desde el día 3 y se pueden utilizarse para realizar ensayos funcionales (por ejemplo, ELISpot para determinar la liberación de IFN $\gamma$ , véase el Ejemplo 6) desde el día 5. Desde el día 10, o cuando las células están disminuyendo la división y reduciendo su tamaño, las células se congelan en alícuotas de al menos  $4 \times 10^6$  células/vial (a  $1 \times 10^7$  células/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %) para su conservación.

(c) Gen de RLC parental para la transfección de linfocitos T mediante los métodos (a) y (b) anteriores

La Figura 7 es una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 23) que codifica el RLC de AFP parental (con codones optimizados para obtener una máxima expresión en células humanas). Es una construcción de un solo marco abierto de lectura de cadena alfa de longitud completa - 2A de teschovirus-1 porcino - cadena beta de longitud completa. La secuencia 2A está subrayada y está precedida por nucleótidos que codifican un sitio de escisión de furina para ayudar a la eliminación proteolítica de la secuencia 2A (que se analiza más adelante en relación con la Fig. 8 (SEQ ID NO: 24). La omisión del enlace peptídico durante la traducción de la proteína del ARNm en el extremo 3' de la secuencia 2A produce dos proteínas: 1) fusión de cadena alfa de RLC-2A, 2) cadena beta de RLC. La SEQ ID NO: 23 incluye los sitios de restricción NheI y Sall (subrayados).

La Figura 8 es la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 24) correspondiente a la figura 7 En la figura 8:

M1-Q22 es una secuencia líder que se elimina al madurar la cadena alfa de RLC parental;  
 Q23-S274 corresponde a la secuencia de la cadena alfa parental;  
 Q23-N246 corresponde al dominio extracelular de la cadena alfa parental;  
 L247-T268 es la región transmembrana de la cadena alfa del RLC maduro;  
 L269-S274 es la región intracelular de la cadena alfa del RLC maduro;  
 R277-R280 es el sitio de escisión de furina para ayudar a la eliminación proteolítica, en el aparato de Golgi, de la secuencia A285-P303 de P2A;  
 G275, S276, S281 a G284, son enlazadores flexibles que permiten la plena función de la escisión de furina y de las secuencias P2A;  
 R304-V323 es una secuencia líder que se elimina al madurar la cadena beta de RLC parental;  
 D324-G614 corresponde a la secuencia de la cadena beta parental;  
 D324-E585 corresponde al dominio extracelular de la cadena beta parental;  
 I586-V607 es la región transmembrana de la cadena beta del RLC maduro;  
 K608-G614 es la región intracelular de la cadena beta del RLC maduro.

(d) linfocitos T transfectadas con RLC de AFP parental y de alta afinidad

Siguiendo los procedimientos descritos en los apartados (a) y (b) anteriores, el gen de RLT alfa-2A-beta de AFP parental (SEQ ID NO: 23 (Figura 7)) se insertó en el vector lenti pELNSxv utilizando los sitios de restricción NheI y Sall únicos para ambas construcciones de ADN, y se crearon linfocitos T transfectados.

De manera similar, los linfocitos T pueden crearse por transfección con genes idénticos a la SEC ID NO: 23 (Fig. 7), excepto que codifican un dominio variable de cadena alfa que tiene una de las SEQ ID NO: 6 a 20 asociadas con la secuencia de dominio variable (D1 a T112) de la cadena beta parental SEQ ID NO: 3;

Ejemplo 6

Activación de linfocitos T modificados por ingeniería genética con RLC de AFP

El siguiente ensayo se llevó a cabo para demostrar la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC) transducidos con RLC en respuesta a líneas de células tumorales. La producción de IFN- $\gamma$ , medida utilizando el ensayo ELISPOT, se utilizó como una lectura de la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC).

### Ensayos ELISPOT

65 *Reactivos*

Medios de ensayo: FCS al 10 % (Gibco, n.º de cat 2011-09), RPMI 1640 al 88 % (Gibco, n.º de cat. 42401), glutamina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 25030) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 15070-063).  
Tampón de lavado: PBS 0,01 M/Tween 20 PBS al 0,05 % (Gibco, n.º de cat. 10010)

- 5 El kit ELISPOT de IFN $\gamma$  humano (BD Bioscience; n.º de cat. 551849) contiene anticuerpos de captura y de detección y placas ELISPOT de PVDF (fluoruro de polivinilideno) de 96 pocillos para IFN- $\gamma$  humano, con el conjunto de sustrato AEC asociado (BD Bioscience, n.º de cat. 551951)

Métodos

10 *Preparación de células diana*

Las células diana utilizadas en este método eran células presentadoras de epítomos naturales: células de carcinoma hepatocelular HepG2 que eran HLA-A2+AFP+. Como control negativo se utilizaron hepatocitos humanos normales HEP2 que eran HLA-A2+AFP-. En una centrifugadora Megafuge® 1.0 (Heraeus), una cantidad suficiente de células diana (50 000 células/pocillo) se lavó mediante centrifugación, tres veces a 1 200 rpm durante 10 min. Después, las células se volvieron a suspender en medios de ensayo a 10<sup>6</sup> células/ml.

20 *Preparación de células efectoras*

Las células efectoras (linfocitos T) utilizadas en este método fueron linfocitos de sangre periférica (LSP), obtenidos por selección negativa utilizando kits de microperlas para CD14 y CD25 (Miltenyi Biotech n.º de cat. 130-050-201 y 130-092-983 respectivamente) a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recién aisladas de la sangre venosa de voluntarios sanos. Las células se estimularon con perlas revestidas con antiCD3/CD28 (Dynabeads® expansoras de linfocitos T de Invitrogen), se transdujeron con lentivirus que llevaban el gen que codificaba el RLC  $\alpha\beta$  completo de interés (basándose en la construcción descrita en el Ejemplo 5 y mostrada en la Figura 7) y se expandieron en medios de ensayo que contenían IL-2 50 U/ml, hasta entre 10 y 13 días después de la transducción. Después, estas células se colocaron en medios de ensayo antes de lavar por centrifugación a 1 200 rpm, durante 10 min en una Megafuge® 1.0 (Heraeus). Las células se volvieron a suspender en medios de ensayo a 4X la concentración final requerida.

Las placas se prepararon de la siguiente manera: En 10 ml de PBS estéril, se diluyeron 100  $\mu$ l de anticuerpo de captura anti-IFN- $\gamma$  por placa. Después, en cada pocillo, se dispensaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura diluido. Después, las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Tras la incubación las placas se lavaron (programa 1, placas de tipo 2, lavapacas Ultrawash Plus de 96 pocillos; Dynex) para eliminar el anticuerpo de captura. Después, las placas se bloquearon añadiendo a cada pocillo 200  $\mu$ l de medio de ensayo y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después, el medio de ensayo se eliminó de las placas mediante lavado (programa 1, placas de tipo 2, lavapacas Ultrawash Plus de 96 pocillos, Dynex) y cualquier medio restante se eliminó sacudiendo y golpeando ligeramente las placas ELISPOT sobre una toallita de papel.

40 Después, a la placa ELISPOT, se añadieron los constituyentes del ensayo en el siguiente orden:

- 45 50  $\mu$ l de células diana 10<sup>6</sup> células/ml (dando un total de 50 000 células diana/pocillo)  
50  $\mu$ l de medio (medio de ensayo)  
50  $\mu$ l de células efectoras (20 000 células LSP transducidas con RLC/pocillo)

Después, las placas se incubaron durante la noche (37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %). Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces (programa 1, placas de tipo 2, lavapacas Ultrawash Plus de 96 pocillos, Dynex) con tampón de lavado y se secaron en una toallita de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Después, a cada pocillo, se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo de detección primaria. El anticuerpo de detección primaria se diluyó en 10 ml de tampón de dilución (el volumen requerido para una sola placa) utilizando la dilución especificada en las instrucciones del fabricante. Las placas se incubaron después a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de lavarse tres veces (programa 1, placas de tipo 2, lavapacas Ultrawash Plus de 96 pocillos, Dynex) con tampón de lavado; el exceso de tampón de lavado se eliminó golpeando ligeramente la placa en una toallita de papel.

La detección secundaria se realizó añadiendo, a cada pocillo, 100  $\mu$ l de estreptavidina diluida conjugada con HRP (siglas del inglés *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante) e incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. La estreptavidina conjugada con HRP se diluyó en 10 ml de tampón de dilución (el volumen que se necesita para una sola placa), utilizando la dilución especificada en las instrucciones del fabricante. Las placas se lavaron tres veces (programa 1, placas de tipo 2, lavapacas Ultrawash Plus de 96 pocillos, Dynex) con tampón de lavado y se golpearon ligeramente en una toallita de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Después, las placas se lavaron dos veces con PBS añadiendo 200  $\mu$ l a cada pocillo, se sacudieron y se golpearon ligeramente sobre una toallita de papel para eliminar el exceso de tampón. No más de 15 minutos antes de su uso, se añadió una gota (20  $\mu$ l) de cromógeno AEC a cada 1 ml de sustrato AEC y se mezcló. Para cada placa, se prepararon 10 ml de esta solución; se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo. Después, la placa se protegió de la luz con una lámina y se controló regularmente el revelado de las manchas, que normalmente se produce al cabo de 5-20 minutos. Las placas se lavaron

en agua corriente para finalizar la reacción de revelado y se secaron sacudiéndolas antes de desensamblarlas en tres partes constituyentes. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de contar las manchas utilizando un lector de placas Immunospot® (CTL; Cellular Technology Limited).

5 **RESULTADOS**

La liberación de IFN $\gamma$  por linfocitos T activados transducidos con RLC en respuesta a una variedad de líneas celulares tumorales positivas a AFP y de control, se analizó mediante ensayo ELISPOT (como se describe anteriormente). El número de manchas ELISPOT observado en cada uno de los pocillos, se representó gráficamente utilizando el programa Graph Pad Prism®.

15 Linfocitos T CD4+, CD8+ o CD4+/CD8+ mezclados, que expresaban el RLC TS (de tipo silvestre) o uno de los RLC N°: 1-5 (como se describe en la tabla a continuación), se incubaron con la línea celular tumoral HepG2 AFP+ HLA:A2+ o con hepatocitos normales HEP2 AFP-HLA:A2+. Como control se utilizó una muestra que no contenía linfocitos T.

RLC N°	dominio variable $\alpha$ de RLC SEQ ID NO:	dominio variable $\beta$ de RLC SEQ ID NO:
1	11	de D1 a T112 de SEQ ID NO: 3
2	12	de D1 a T112 de SEQ ID NO: 3
3	13	de D1 a T112 de SEQ ID NO: 3
4	14	de D1 a T112 de SEQ ID NO: 3
5	15	de D1 a T112 de SEQ ID NO: 3

20 La Figura 9 demuestra que los linfocitos T transducidos con los RLC descritos en la tabla anterior, se activan en respuesta a células tumorales (HepG2) positivas a AFP. La activación de estos RLC variantes es mayor que la del RLC TS. La activación por hepatocitos normales (HEP2) negativos a AFP es mínima, lo que demuestra la especificidad de los RLC para la AFP.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Adaptimmune Ltd
- <120> Receptores de linfocitos T
- <130> P58244WO / NJL
- 30 <150> GB1313377.2
- <151> 26-07-2013
- <160> 28
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 9
- 40 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

Phe Met Asn Lys Phe Ile Tyr Glu Ile  
1 5

- 45 <210> 2
- <211> 205
- <212> PRT
- 50 <213> *Homo sapiens*
- <400> 2

ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 3  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

ES 2 734 190 T3

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



ES 2 734 190 T3

<210> 4  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

10 <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 Gly 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

ES 2 734 190 T3

<210> 5  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> dominio extracelular de la cadena beta del receptor de linfocitos T  
  
 10 <400> 5

```

Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val
          20          25          30

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

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe
50          55          60

Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser
65          70          75          80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly
          85          90          95
    
```

ES 2 734 190 T3

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

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 115 120 125

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 130 135 140

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn  
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys  
 165 170 175

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu  
 180 185 190

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
 195 200 205

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 210 215 220

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
 225 230 235 240

Ala Asp

<210> 6  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

10

<400> 6

ES 2 734 190 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 Gly Ser Gln Ala  
 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 7

<211> 205

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

10

ES 2 734 190 T3

<400> 7

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 Gly 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 Val Asn Ser Asp Ser Ser  
85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
195 200 205

- 5 <210> 8
- <211> 205
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 8

ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 9  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 9

ES 2 734 190 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 Gly Ser Gln Ala  
 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 10  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 10

5

10

ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Gln Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 11

<211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 11

5

10



ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Gln Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ser Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 12  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 12

ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Gln Ser Ser  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 13  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 13

5

10

ES 2 734 190 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 Gly Ser Gln Ala  
 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 Val Asn Ser Gln Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 14  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 14

ES 2 734 190 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 Gly 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 Val Asn Ser Gln Ser Gly  
 85 90 95

Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 15

<211> 205

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

10

ES 2 734 190 T3

<400> 15

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 Gly 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 Val Asn Ser Gln Asn Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 16  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 16

ES 2 734 190 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 Gly Ser Phe 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

- 5 <210> 17
- <211> 205
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T
- <400> 17

ES 2 734 190 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 Gly Ser Tyr 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 18  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 18

5

10

ES 2 734 190 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 Gly Ser Tyr 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 Val Asn Ser Asp Ser Ser  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

<210> 19

<211> 205

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

10



ES 2 734 190 T3

<400> 19

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 Gly Ser Tyr 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 Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 20  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> dominio variable de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 20

ES 2 734 190 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 Gly Ser Tyr 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 Val Asn Ser Gln Ser Gly  
 85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205

5 <210> 21  
 <211> 615  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de linfocitos T

<400> 21

ES 2 734 190 T3

caaaaagaag ttgagcagaa ttctggaccc ctcaagtgttc cagagggagc cattgcctct 60  
ctcaactgca cttacagtga ccgaggttcc cagtccttct tctggtacag acaatattct 120  
gggaaaagcc ctgagttgat aatgtccata tactccaatg gtgacaaaga agatggaagg 180  
tttacagcac agctcaataa agccagccag tatgtttctc tgctcatcag agactcccag 240  
cccagtgatt cagccaccta cctctgtgcc gtgaatagtg attccgggta tgcactcaac 300  
ttcggcaaag gcacctcgct gttggtcaca ccccatatcc agaaccctga ccctgccgtg 360  
taccagctga gagactctaa gtcgagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 420  
tctcaaacia atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaatgtgtg 480  
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgctg tggcctggag caacaaatct 540  
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 600  
agcccagaaa gttcc 615

5 <210> 22  
<211> 726  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de linfocitos T  
<400> 22

gattctggag tcacacaaac cccaaagcac ctgatcacag caactggaca gcgagtgacg 60  
ctgagatgct cccctaggtc tggagacctc tctgtgtact ggtaccaaca gagcctggac 120  
cagggcctcc agttcctcat tcagtattat aatggagaag agagagcaaa aggaaacatt 180  
cttgaacgat tctccgcaca acagttccct gacttgcact ctgaactaaa cctgagctct 240  
ctggagctgg gggactcagc tttgtatttc tgtgccagca gcctcggggg ggaatctgag 300  
cagtacttcg ggccgggcac caggctcacg gtcacagagg acctgaaaaa cgtgttccca 360  
cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca 420  
ctggtgtgcc tggccaccgg tttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 480  
gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc 540  
ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac cttctggcag 600  
gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 660  
tggaccagc atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 720  
gcagac 726

15 <210> 23  
<211> 1867  
<212> ADN

ES 2 734 190 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> receptor de linfocitos T fusionado a 2A de teschovirus-1 porcino

5

<400> 23

gctagccgcc accatgatga agtccctgcg ggtgctgctg gtcatacctgt ggctgcagct	60
gtcctgggtc tgggccagc agaaagaggt ggagcagaac agcggccctc tgagcgtgcc	120
cgagggcgct atcgccagcc tgaactgcac ctacagcgac agaggcagcc agagcttctt	180
ctggtacaga cagtacagcg gcaagagccc cgagctgac atgagcatct acagcaacgg	240
cgacaaagag gacggccggt tcaccgcca gctgaacaag gccagccagt acgtgtccct	300
gctgatccgg gacagccagc ccagcgacag cgccacctac ctgtgcgccg tgaacagcga	360
ctccggctac gccctgaact tcggcaaggg caccagcctg ctggtgacac cccacattca	420
gaaccccgac cccgccgtgt accagctgcg ggacagcaag agcagcgaca agagcgtgtg	480
cctgttcacc gacttcgaca gccagaccaa cgtgtcccag agcaaggaca gcgacgtgta	540
catcaccgac aagaccgtgc tggacatgcg gagcatggac ttcaagagca acagcgcctg	600
ggcctggtcc aacaagagcg acttcgcctg cgccaacgcc ttcaacaaca gcatcatccc	660
cgaggacaca tttttccaa gccccgagag cagctgcgac gtcaaactgg tggagaagtc	720

ES 2 734 190 T3

cttcgagaca gacaccaacc tgaacttcca gaacctgagc gtgatcggct tcagaatcct 780  
gctgctgaag gtggccggct tcaatctgct gatgaccctg cggctgtggt ccagcggcag 840  
cagagccaag agaagcggat ccggcggcac caacttcagc ctgctgaagc aggccggcga 900  
cgtggaggaa aaccctggcc ctaggatggg cttccggctg ctgtgctgcy tggccttctg 960  
cctgctggga gccggccctg tggatagcgg cgtgaccag acccccaagc acctgatcac 1020  
cgccaccggc cagagagtga ccctgcgctg cagccctaga agcggcgacc tgtccgtgta 1080  
ctggtatcag cagagcctgg accagggact gcagttcctc atccagtact acaacggcga 1140  
ggaacggggc aagggaaca tcctggaaag attcagcgcc cagcagttcc ccgacctgca 1200  
cagcgagctg aacctgagca gcctggaact gggcgactcc gccctgtact tctgcgccag 1260  
cagcctgggc ggcgagagcg aacagtactt cggccctggc acccggtga cggtaaccga 1320  
ggacctgaag aacgtgttcc cccagaggt ggccgtgttc gagccctctg aggccgagat 1380  
cagccacacc cagaaagcca ccctggtctg cctggccacc ggcttctacc ccgaccacgt 1440  
ggaactgtct tgggtgggtga acggcaaaga ggtgcacagc ggcgtcagca ccgaccctca 1500  
gcccctgaaa gagcagcccg ccctgaacga cagccggtac tgcctgagca gcagactgcy 1560  
ggtgtccgcc accttctggc agaacccccg gaaccacttc agatgccagg tgcagttcta 1620  
cggcctgagc gagaacgacg agtggacca ggaccgggcc aagcctgtga cccagatcgt 1680  
gtctgccgaa gcatgggggc gcgccgattg cggcttcaca agcgagagct accagcaggg 1740  
cgtgctgagc gccaccatcc tgtacgagat cctgctgggc aaggccacc tgtacgccgt 1800  
gctggtgtcc gctctggtgc tgatggccat ggtgaaacgg aaggacagcc ggggctaata 1860  
agtcgac 1867

<210> 24  
<211> 614  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> receptor de linfocitos T fusionado a 2A de teschovirus-1 porcino

<400> 24

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu  
1 5 10 15  
Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro  
20 25 30  
Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser  
35 40 45

ES 2 734 190 T3

Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys  
 50 55 60  
 Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu  
 85 90 95  
 Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala  
 100 105 110  
 Val Asn Ser Asp Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser  
 115 120 125  
 Leu Leu Val Thr Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
 130 135 140  
 Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
 165 170 175  
 Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
 180 185 190  
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
 195 200 205  
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
 210 215 220  
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245 250 255  
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260 265 270  
 Ser Ser Gly Ser Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe  
 275 280 285  
 Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg  
 290 295 300

ES 2 734 190 T3

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala  
 305 310 315 320

Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr  
 325 330 335

Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp  
 340 345 350

Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe  
 355 360 365

Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu  
 370 375 380

Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn  
 385 390 395 400

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser  
 405 410 415

Ser Leu Gly Gly Glu Ser Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
 420 425 430

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 435 440 445

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 450 455 460

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 465 470 475 480

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 485 490 495

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
 500 505 510

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
 515 520 525

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 530 535 540

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 545 550 555 560

ES 2 734 190 T3

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
 565 570 575

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 580 585 590

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 595 600 605

Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 610

5 <210> 25  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 25  
 gaattccata tgcaaaaaga agtgaacaa aattctggac ccctc 45

15 <210> 26  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de PCR

25 <400> 26  
 ttgtcagtcg acttagagtc tctcagctgg tacacg 36

30 <210> 27  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 27  
 gaattccata tggattctgg agttacacaa acccCAAAGC acctg 45

40 <210> 28  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

45 <400> 28  
 tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc 32



**REIVINDICACIONES**

1. Un receptor de linfocitos T (RLC) de origen no natural y/o purificado y/o modificado por ingeniería genética, que tiene la propiedad de unirse al complejo FMNKFIYEI (SEQ ID NO: 1) HLA-A2 y que comprende al menos un dominio variable de la cadena alfa de RLC y al menos un dominio variable de la cadena beta de RLC, comprendiendo el dominio variable de la cadena alfa de Q1 a H112 de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 15, y comprendiendo el dominio variable de la cadena beta de D1 a T112 de la SEQ ID NO: 3.
2. El RLC de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de dominio constante TRAC de cadena alfa y/o una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 de cadena beta.
3. El RLC de la reivindicación 2, en donde, la(s) secuencia(s) de dominio constante de la cadena alfa y/o beta se modifica(n) mediante truncamiento o sustitución para eliminar el enlace disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.
4. El RLC de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en donde la(s) secuencia(s) del dominio constante de la cadena alfa y/o beta se modifica(n) mediante la sustitución de restos de cisteína por Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2, formando las cisteínas un enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del RLC.
5. El RLC de cualquier reivindicación anterior, que está en formato de una sola cadena del tipo  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$  o  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ , en donde  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, del RLC,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, del RLC y L es una secuencia enlazadora.
6. El RLC de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un heterodímero alfa-beta.
7. El RLC de cualquier reivindicación anterior asociado con un marcador detectable, un agente terapéutico o un grupo modificador de PK.
8. Ácido nucleico de origen no natural y/o purificado y/o modificado por ingeniería genética que codifica el RLC de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Una célula de origen no natural y/o purificada y/o modificada por ingeniería genética que presenta un RLC según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. Una célula según la reivindicación 9, que es un linfocito T.
11. Una célula que contiene
- (a) un vector de expresión de RLC que comprende ácido nucleico según la reivindicación 8 que codifica en un solo marco abierto de lectura, o en dos marcos abiertos de lectura distintos, la cadena alfa y la cadena beta respectivamente; o
- (b) un primer vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa de un RLC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un segundo vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena beta de un RLC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Una composición farmacéutica que comprende un RLC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una célula según la reivindicación 9, 10 u 11, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Un RLC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una célula según la reivindicación 9, 10 u 11, para su uso en medicina.
14. El RLC o la célula para el uso de la reivindicación 13, para su uso en un método de tratamiento de cáncer.
15. El RLC o la célula para el uso de la reivindicación 14, en donde el método comprende terapia adoptiva.

**Figura 1**

**Secuencia de aminoácidos extracelular (SEQ ID NO: 2) de la cadena alfa del RLC de AFP parental TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC**

```

                10                20
                *                *
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

        30                40                50
        *                *                *
R G 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

                60                70                80
                *                *                *
D K 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

                90                100
                *                *
S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L

    110                120                130
    *                *                *
V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L

                140                150                160
                *                *                *
F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D

                170                180
                *                *
M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N

    190                200
    *                *
N S I I P E D T F F P S P E S S
    
```

**Figura 2**

**Secuencia de aminoácidos extracelular (SEQ ID NO: 3) de la cadena beta del RLC de AFP parental TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2**

```

                10                20
                *                *
D S G V T Q T P K H L I T A T G Q R V T L R C S P R S

        30                40                50
        *                *                *
G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N G E E

                60                70                80
                *                *                *
R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L

                90                100
                *                *
E L G D S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R

    110                120                130
    *                *                *
L T V T E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H

                140                150                160
                *                *                *
T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K

                170                180
                *                *
E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S

    190                200                210
    *                *                *
S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S

                220                230                240
                *                *                *
E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D
    
```

**Figura 3**

**Secuencia de aminoácidos extracelular de la cadena alfa de RLC específico de AFP parental – cadena alfa de RLC de referencia, con una cisteína (en negrita y subrayada) sustituida por T159 (es decir T48 de TRAC) (SEQ ID NO: 4)**

```

                10                20
                *                *
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

        30                40                50
        *                *                *
R G 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

                60                70                80
                *                *                *
D K 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

                90                100
                *                *
S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L

        110                120                130
        *                *                *
V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L

                140                150                160
                *                *                *
F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D

                170                180
                *                *
M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N

        190                200
        *                *
N S I I P E D T F F P S P E S S
    
```

**Figura 4**

**Secuencia de aminoácidos extracelular de la cadena beta de RLC específico de AFP parental – cadena beta de RLC de referencia, con una cisteína (en negrita y subrayada) sustituida por S168 (es decir S57 de TRBC2) y con A187 sustituida por C187 y D201 sustituida por N201 (SEQ ID NO: 5)**

```

                10                20
                *                *
D S G V T Q T P K H L I T A T G Q R V T L R C S P R S
                30                40                50
                *                *                *
G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N G E E
                60                70                80
                *                *                *
R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L
                90                100
                *                *
E L G D S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R
                110                120                130
                *                *                *
L T V T E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H
                140                150                160
                *                *                *
T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K
                170                180
                *                *
E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S
                190                200                210
                *                *                *
S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S
                220                230                240
                *                *                *
E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D
    
```

**Figura 5**

**Secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa (SEQ ID NO: 6-20)**

**ADB 327 (SEQ ID NO: 6)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 329 (SEQ ID NO: 7)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSSYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 330 (SEQ ID NO: 8)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGVALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 331 (SEQ ID NO: 9)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGVALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 328 (SEQ ID NO: 10)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 352 (SEQ ID NO: 11)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGYSLNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 350 (SEQ ID NO: 12)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**ADB 332 (SEQ ID NO: 13)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
 NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNSDSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDK  
 SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT  
 FFPSPSS

**Figura 5 continuación**

**ADB 351 (SEQ ID NO: 14)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF~~FW~~YRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NSQ~~SG~~V~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 349 (SEQ ID NO: 15)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF~~FW~~YRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NSQ~~NG~~Y~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 353 (SEQ ID NO: 16)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS~~S~~SFFWYRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NS~~DS~~GY~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 326 (SEQ ID NO: 17)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS~~Y~~SFFWYRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NS~~DS~~GY~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 333 (SEQ ID NO: 18)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS~~Y~~SFFWYRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NS~~DS~~Y~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 334 (SEQ ID NO: 19)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS~~Y~~SFFWYRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NS~~DS~~GV~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**ADB 335 (SEQ ID NO: 20)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS~~Y~~SFFWYRQYSGKSP~~EL~~IMSIYSNGDKEDGRFTAQL  
NKASQYV~~SL~~LIRDSQP~~SD~~SATYLC~~AV~~NSQ~~SG~~Y~~AL~~NFGKGT~~SLL~~VTPHIQNPDP~~AV~~YQLRDSKSSDK  
SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN~~SA~~VAWSNKSD~~FAC~~ANAFNNSIIPEDT  
FFPSPESS

**Figura 6**

**Secuencia de ADN de la cadena alfa del RLC de referencia (SEQ ID NO:21)**

caaaaagaagttgagcagaattctggaccctcagtgttccagagggagccattgcctctctcaactgcactt  
acagtgaccgaggtcccagtccttcttctgggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtc  
catatactccaatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttct  
ctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgcccgtgaatagtgattccgggtatg  
cactcaacttcggcaaaggcacctcgtggtggtcacaccccatatccagaaccctgaccctgcccgtgtacca  
gctgagagactctaagtcgagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatggtgca  
caaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaa **tgt**gtgctagacatgagggtctatggacttcaagagca  
acagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccaga  
agacaccttcttcccagcccagaaagtcc

**Secuencia de ADN de la cadena beta del RLC de referencia (SEQ ID NO:22)**

gattctggagtcacacaaaccccaaagcacctgatcacagcaactggacagcgagtgacgctgagatgctccc  
ctaggtctggagacctctctgtgtaactggtaccaacagagcctggaccagggcctccagttcctcattcagta  
ttataatggagaagagagagcaaaaggaaacattcttgaacgattctccgcacaacagttccctgacttgac  
tctgaactaaacctgagctctctggagctgggggactcagctttgtatttctgtgccagcagcctcggggggg  
aatctgagcagtaacttcgggcccgggaccaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccaccga  
ggtcgtctgtttgagccatcagaagcagagatctcccaccccaaaaggccacactggtgtgctggccacc  
ggtttctaccccgaccacgtggagctgagctgggtggtgaaatgggaaggaggtgcacagtggggtc **tgc**acag  
acccgagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctctgagcagccgctgaggggtctc  
ggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgac  
gagtggaccaggatagggcaaaccctcaccagatcgtcagcgcgaggcctggggtagagcagac



**Figura 7**

**Secuencia de ADN de la cadena alfa - 2A - cadena beta del RLC de AFP parental con la secuencia 2A de teschovirus - 1 porcino (en negrita y subrayada) (SEQ ID NO: 23) Los sitios de las enzimas de restricción se indican subrayados**

gctagccgccaccatgatgaagtcctgcggtgctgctggtcatcctgtggctgcagctgtcctgggtctgg  
 tcccagcagaaaagaggtggagcagaacagcggcctctgagcgtgcccagggcgctatcgccagcctgaact  
 gcacctacagcgacagaggcagccagagcttcttctgtgtacagacagtacagcggcaagagccccgagctgat  
 catgagcatctacagcaacggcgacaaaagaggacggcgggttcaccgcccagctgaacaaggccagccagtac  
 gtgtccctgctgatccgggacagccagcccagcgacagcggccacctacctgtgcgccgtgaacagcgactccg  
 gctacgcccctgaacttcggcaagggcaccagcctgctggtgacacccccacattcagaacccccgacccccgct  
 gtaccagctgcgggacagcaagagcagcgcacaagagcgtgtgctgttcaccgacttcgacagccagaccaac  
 gtgtcccagagcaaggacagcgactgtatcatcaccgacaagaccgtgctggacatgctggagcatggacttca  
 agagcaacagcgcctgtggcctggtccaacaagagcgaacttcgctgcccacgccttcaacaacagcatcat  
 ccccgaggacacatttttccaagccccgagagcagctgcgacgtcaaaactggtggagaagtccctcgagaca  
 gacaccaacctgaacttcagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctgaaggtggccggcttca  
 atctgctgatgaccctgcggtgtggtccagcggcagcagagccaagagaagcggatccggg**gccaccaactt**  
**cagcctgctgaagcaggccggcgacgtggaggaaaacctggccct**aggatgggcttccggtgctgtgctgc  
 gtggccttctgctgctgggagccggcctgtggatagcggcgtgacccagaccccccaagcacctgatcaccg  
 ccaccggccagagagtgacctgctgctgcagccctagaagcggcgacctgtccgtgactgggtatcagcagag  
 cctggaccagggactgcagttcctcatccagtactacaacggcgaggaacgggccaagggcaacatcctggaa  
 agattcagcgcaccagcagttccccgacctgcacagcgagctgaacctgagcagcctggaactgggcgactccg  
 ccctgtacttctgcccagcagcctggcgcgagagcgaacagtaacttcggccctggcaccggctgacggt  
 aaccgaggacctgaagaacgtgttccccccagaggtggcctgttcgagccctctgaggccgagatcagccac  
 acccagaaaagccacctggtctgctgctggccaccggcttctaccccgaccacgtggaactgtcttgggtgggtga  
 acggcaaaagaggtgcacagcggcgtcagcaccgacctcagcccctgaaagagcagcccgcctgaaacgacag  
 ccggtactgcctgagcagcagactgcgggtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgc  
 caggtgcagttctacggcctgagcgcgagaacgacgagtgaccaccagaccgggccaagcctgtgaccagatcg  
 tgtctgccgaagcatggggcgccgattgcggttcacaagcgagagctaccagcagggcgtgctgagcgc  
 caccatcctgtacgagatcctgctgggcaaggccacctgtacgcccgtgctggtgtccgctctggtgctgatg  
 gccatggtgaaacggaaggacagccggggctaataag**tcgac**

**Figura 8**

**Secuencia de aminoácidos de la cadena alfa - 2A - cadena beta del RLC de AFP parental con la secuencia 2A de teschovirus - 1 porcino (en negrita y subrayada) (SEQ ID NO: 24)**

```

          10          20          30
          *          *          *
M M K S L R V L L V I L W L Q L S W V W S Q Q K E V E Q N S G P L S
      40          50          60
          *          *          *
V P E G A I A S L N C T Y S D R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L
      70          80          90          100
          *          *          *          *
I M S I Y S N G D K E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q
          110          120          130
          *          *          *
P S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L V T P H I Q
      140          150          160          170
          *          *          *          *
N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S
          180          190          200
          *          *          *
K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F
          210          220          230
          *          *          *
A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E
      240          250          260          270
          *          *          *          *
T D T N L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W
          280          290          300
          *          *          *
S S G S R A K R S G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P R M G
      310          320          330          340
          *          *          *          *
F R L L C C V A F C L L G A G P V D S G V T Q T P K H L I T A T G Q
          350          360          370
          *          *          *
R V T L R C S P R S G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N
    
```

**Figura 8 continuación**

```

          380              390              400
          *                *                *
G E E R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L E L G D
410          420          430          440
  *                *                *
S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V F
          450          460          470
          *                *                *
P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V
          480          490          500          510
  *                *                *                *
E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C
          520          530          540
          *                *                *
L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W
          550          560          570
          *                *                *
T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L
580          590          600          610
  *                *                *                *
S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S

```

R G

**Figura 9**

**Activación de linfocitos T modificados por ingeniería genética con RLC de AFP (producción de INF $\gamma$ )**

