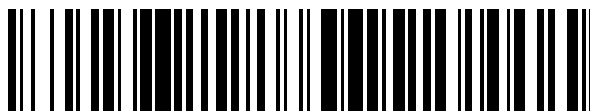


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 930**

51 Int. Cl.:

C40B 40/10 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/EP2015/055293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15709505 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3116901**

54 Título: **Bibliotecas de TCR**

30 Prioridad:

14.03.2014 GB 201404536

14.03.2014 US 201461953114 P

02.12.2014 GB 201421336

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

07.02.2020

73 Titular/es:

IMMUNOCORE LIMITED (50.0%)

101 Park Drive, Milton Park

Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB y

ADAPT IMMUNE LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

JAKOBSEN, BENT KARSTEN;

MOLLOY, PETER EAMON;

VIDEPOT, ANNE LISE BRIGITTE y

LIDDY, NATHANIEL ROSS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 740 930 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

Bibliotecas de TCR

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de receptores de linfocitos T (TCR) diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6.

Antecedentes

15 Los receptores de linfocitos T (TCR) median en el reconocimiento de antígenos peptídicos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por linfocitos T y son esenciales para el funcionamiento de la rama celular del sistema inmunitario. Los TCR existen solo en forma unida a la membrana y por esta razón los TCR son históricamente muy difíciles de aislar. La mayoría de los TCR se componen de dos cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, la cadena alfa y beta.

20 Los TCR se describen en el presente documento utilizando la nomenclatura de *International Immunogenetics* (IMGT) de TCR y enlaces con la base de datos pública de secuencias de TCR de IMGT. Los TCR 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 con frecuencia se considera parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) hipervariables integradas en una secuencia estructural; se cree que CDR3 es el mediador principal del reconocimiento de antígeno. 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 sus secuencias estructurales, de CDR1 y de CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos de $V\alpha$ se denominan mediante un número TRAV particular. Por tanto, "TRAV21" define una región $V\alpha$ de TCR que tiene secuencias estructurales y de CDR1 y de CDR2 particulares y una secuencia de CDR3 definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva entre TCR pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía entre TCR. De la misma manera, "TRBV6-5" define una región $V\beta$ de TCR que tiene secuencias estructurales y de CDR1 y de CDR2 particulares, pero solo con una secuencia de CDR3 parcialmente definida. Para los fines de esta solicitud, los inventores usan la suposición general de que hay 54 genes variables alfa funcionales y 67 genes variables beta funcionales dentro de los loci alfa y beta respectivamente. Sin embargo, este número puede variar a medida que avanza la investigación y el número de genes variables alfa y beta puede considerarse diferente al actual debido a las definiciones de funcionalidad o duplicaciones. Por tanto, para mayor claridad, se hace referencia constantemente a la nomenclatura de *International Immunogenetics* (IMGT) de TCR como se encuentra en el sitio web de IMGT www.imgt.org (accedido el 10 de marzo de 2013).

Las regiones de unión de los TCR 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.

45 En la nomenclatura IMGT, la región de diversidad de cadena beta se denomina mediante la abreviatura TRBD y, como se ha mencionado, las regiones TRBD/TRBJ concatenadas con frecuencia se consideran en conjunto la región de unión.

50 Los grupos de genes que codifican las cadenas alfa y beta de TCR se localizan en diferentes cromosomas y contienen segmentos génicos V, (D), J y C separados, que se unen por reordenamiento durante el desarrollo de linfocitos T. Esto conduce a una diversidad muy alta de cadenas alfa y beta de linfocitos T debido a la gran cantidad de posibles eventos de recombinación que se producen entre los 54 genes variables alfa de TCR y 61 genes alfa J o entre los 67 genes variables beta, dos genes beta D y 13 genes beta J. El proceso de recombinación no es preciso e introduce más diversidad dentro de la región CDR3. Cada gen variable alfa y beta también puede comprender variantes alélicas, designadas en la nomenclatura IMGT TRAVxx*01 y *02 o TRBVx-x*01 y *02 respectivamente, aumentando de este modo adicionalmente la cantidad de variación. De la misma manera, algunas de las secuencias de TRBJ tienen dos variaciones conocidas. (Obsérvese que la ausencia de un modificador "*" significa que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante). Se ha estimado que el repertorio natural de TCR humanos resultantes de la recombinación y la selección tímica comprende aproximadamente 10^6 secuencias de cadena beta únicas, determinado a partir de la diversidad de CDR3 (Arstila, T. P., *et al* (1999) *Science*, 286(5441), 958-61) y podría ser incluso mayor (Robins, H.S. *et al.* (2009) *Blood*, 114(9), 4099-4107). Se estima que cada cadena beta se empareja con al menos 25 cadenas alfa diferentes, generando de este modo mayor diversidad (Arstila, T. P., *et al* (1999) *Science*, 286(5441), 958-61).

65 En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "dominio variable alfa (o α) de TCR", por lo tanto, se refiere a la concatenación de las regiones TRAV y TRAJ; solo una región TRAV; o TRAV y una región TRAJ parcial, y la expresión dominio constante alfa (o α) de TCR se refiere a la región TRAC extracelular o a una secuencia

TRAC truncada C-terminal. Análogamente, la expresión "dominio variable beta (o β) de TCR" puede referirse a la concatenación de regiones TRBV y TRBD/TRBJ; solo a las regiones TRBV y TRBD; solo a las regiones TRBV y TRBJ; o a las regiones TRBV y TRBD y/o TRBJ parciales, y la expresión dominio constante beta (o β) de TCR se refiere a la región TRBC extracelular o a una secuencia de TRBC truncada C-terminal.

Las secuencias únicas definidas por la nomenclatura IMGT son muy conocidas y accesibles para quienes trabajan en el campo de los TCR. 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.

Durante mucho tiempo ha sido deseable identificar TCR que consisten esencialmente en secuencias de cadenas alfa y beta naturales que se unen específicamente a antígenos particulares, de modo que, por ejemplo, los TCR, o sus análogos solubles, pueden desarrollarse para proporcionar una base para productos terapéuticos potenciales. Los antígenos reconocidos por los TCR identificados pueden estar asociados con una enfermedad, tal como cáncer, infecciones víricas, enfermedades autoinmunitarias, infecciones parasitarias e infecciones bacterianas. Por lo tanto, dichas terapias pueden usarse para el tratamiento de dichas enfermedades.

Asimismo, una vez que se han identificado TCR naturales o nativos y se han determinado sus secuencias, se pueden introducir mutaciones que dan como resultado un aumento de la afinidad o la semividua, según sea necesario, tal como se describe en el documento WO2012/013913.

Tradicionalmente, los intentos de identificar los TCR que se unen específicamente con antígenos asociados a la enfermedad, tales como antígenos víricos, autoinmunitarios o bacterianos de cáncer, se han limitado al uso de muestras sanguíneas tomadas de donantes voluntarios. Dichas muestras se utilizan para aislar linfocitos T y sus TCR correspondientes que se unen a antígenos asociados a enfermedad. Este enfoque requiere en general al menos 20 donantes. El proceso es largo y laborioso y no hay garantía de que se identifiquen receptores de linfocitos T de unión a antígeno. Cuando se identifican receptores funcionales de linfocitos T, tienen con frecuencia una afinidad débil por el antígeno, baja especificidad y/o no se pliega correctamente *in vitro*. La diversidad de linfocitos T que se pueden explorar se limita a la diversidad de linfocitos T dentro de los donantes. Algunos antígenos asociados a enfermedad, incluyendo la mayoría de antígenos de cáncer, son autoantígenos; ya que la selección tímica sirve para eliminar los TCR que reconocen autoantígenos, los TCR específicos para antígenos asociados a enfermedad pueden no estar presentes en el repertorio natural de los donantes o pueden tener una afinidad débil por el antígeno.

Se han realizado intentos de diseñar una biblioteca para el aislamiento de nuevos TCR con especificidad de unión a antígeno durante varios años. Las bibliotecas de TCR son mucho más difíciles de crear que las bibliotecas de anticuerpos comparables, ya que las cadenas de TCR son menos estables y con frecuencia no se presentan correctamente. Las complejidades implicadas en la construcción de una biblioteca de TCR son enormes. Es preferible conservar la variación en la longitud de CDR3 (como se encuentra en los repertorios naturales). Una parte sustancial de cualquier biblioteca generalmente se pierde debido a codones de terminación, desplazamientos del marco, problemas de plegamiento y combinaciones de cadenas de TCR que simplemente nunca podrían unirse a un complejo HLA. Teniendo en cuenta la enorme cantidad de genes alfa y beta variables, así como los genes J y D, la probabilidad de producir e identificar una cadena alfa plegable funcional y una cadena beta plegable funcional que forman juntas un TCR que se une a un péptido antigénico con la especificidad requerida, es extremadamente baja.

Se han realizado varios intentos de construir bibliotecas. Las primeras descritas a continuación en el presente documento se basan en bibliotecas de TCR sintéticas; es decir, los TCR en la biblioteca contienen mutaciones, normalmente dentro de las CDR, que se han introducido *in vitro* utilizando mutagénesis aleatoria. Por lo tanto, las secuencias de cualquier cadena de TCR individual contenida en estas bibliotecas pueden no corresponder a ninguna encontrada en un repertorio natural. La biblioteca completa no corresponderá a un repertorio natural debido a que solo determinadas mutaciones están presentes en las bibliotecas sintéticas. En las bibliotecas sintéticas desveladas anteriormente, se introdujeron mutaciones aleatorias en las regiones CDR de las cadenas alfa y beta de un solo TCR conocido, de modo que todos los TCR en la biblioteca contienen la misma secuencia estructural alfa y beta pero con secuencias de CDR generadas aleatoriamente. Un análisis posterior de la biblioteca demostró que no tuvo éxito para la identificación de TCR específicos de antígeno. Específicamente, se descubrió que una gran proporción de las cadenas de TCR no eran funcionales, por diversas razones: en muchos casos las secuencias estaban truncadas o contenían cambios de marco. En otros casos, aunque se identificaron cadenas de TCR de longitud completa, no pudieron plegarse correctamente; finalmente, los TCR aislados de la biblioteca no pudieron unirse específicamente a un antígeno cuando se sometieron a ensayos adicionales. Se cree que la diversidad no natural en estas bibliotecas sintéticas puede ser una de las razones por las que las bibliotecas no tuvieron éxito. La introducción de mutaciones no naturales puede interferir con la función apropiada de TCR. Asimismo, la diversidad introducida en CDR3 puede ser limitada en comparación con un repertorio de TCR natural. Como se ilustra por la longitud de la secuencia de CDR3 en un repertorio natural, se genera una enorme diversidad en las secuencias de CDR3 durante el ensamblaje de TCR en linfocitos T. Al basar una biblioteca en mutaciones en localizaciones específicas, la diversidad de secuencias de CDR3 puede estar muy restringida, particularmente con respecto a la longitud de secuencia de CDR3. Finalmente, las secuencias sintéticas de TCR no habrán sido sometidas al proceso de selección tímica que se produce

in vivo.

Estas razones explican de alguna manera, sin pretender quedar ligados a teoría alguna, por qué los intentos de construir bibliotecas a partir de las que se esperaba identificar TCR de unión específica, descritos a continuación, no tuvieron éxito.

El documento WO2005/116646 describe una biblioteca basada en un TCR (natural) conocido en el que las seis CDR se mutaron individualmente o en combinación, es decir, todos los TCR en la biblioteca eran sintéticos pero basados en una región marco conservada de TCR identificada en la naturaleza. El documento WO 2005/114215 se refiere además a productos obtenidos de dicha biblioteca. La biblioteca se exploró con varios otros antígenos (además de aquel al que se unió el TCR original). Sin embargo, esto dio como resultado que se aislara solamente una secuencia productiva de TCR de longitud completa. En experimentos adicionales, se descubrió que este TCR tenía reacción cruzada.

Por tanto, se han construido bibliotecas basadas en TCR mutados *in vitro*, pero no han permitido el aislamiento de nuevos TCR con especificidad de unión a antígeno.

Se ha construido una biblioteca basada en un repertorio completamente natural en donde las cadenas alfa y beta obtenidas de forma natural se mezclaron aleatoriamente, (como se analiza a continuación), pero no tuvo éxito en la identificación de cualquier TCR que se una específicamente al antígeno.

En particular, el documento WO2005/116074 describe una biblioteca de nucleoproteínas, presentando cada uno en su superficie un polipéptido que comprende una secuencia de dominio variable alfa de TCR nativa o una secuencia de dominio variable beta de TCR nativa. La biblioteca descrita en esta publicación se construyó a partir de varias cadenas alfa y beta; se representaron 43 genes de la clase V alfa y 37 genes de la clase V beta en el grupo de ARNm a partir del que se amplificó el ADNc utilizado para generar la biblioteca. En este documento se indica que tres ciclos de presentación de fagos condujeron al aislamiento de clones que se unían al péptido que se ensayaba. Se ha descrito que estos clones se han identificado durante exploración de ELISA según lo determinado por fuertes señales de ELISA. Sin embargo, también se observaron fuertes señales de ELISA cuando estos clones se ensayaron para determinar la unión con un péptido-HLA alternativo; por lo tanto, los clones de TCR no fueron específicos para el péptido. Un análisis posterior de esta biblioteca indicó problemas similares a los descritos anteriormente para bibliotecas sintéticas porque contenían una gran proporción de cadenas de TCR no productivas, así como TCR que no podían plegarse correctamente. Por tanto, la biblioteca descrita en el mismo no fue útil para identificar nuevos TCR de unión a antígeno.

Por lo tanto, existe la necesidad de una biblioteca de TCR que permita la identificación más fiable de TCR funcionales que comprenden un dominio variable de cadena alfa natural y un dominio variable de cadena beta natural, pudiendo dicha biblioteca explorarse usando una diversidad de antígenos peptídicos para identificar dichos TCR útiles. Los TCR identificados se pueden usar después en su afinidad natural o podrían usarse en, por ejemplo, maduración de presentación en fagos, para potenciar la afinidad.

Por lo tanto, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de receptores de linfocitos T (TCR) diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden una cadena alfa que comprende un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y una cadena beta que comprende un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6. Los dominios variables son como se han suministrado anteriormente, es decir, también pueden comprender regiones TRAJ o TRBD y/o TRBJ completas o parciales, respectivamente.

La invención también proporciona como un segundo aspecto una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden una cadena alfa que comprende un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y una cadena beta que comprende un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6 y en donde al menos una parte de los TCR comprende un dominio variable de cadena alfa y/o un dominio variable de cadena beta que comprende una mutación no natural.

El producto génico de TRBV6 puede ser cualquiera de un producto génico de TRBV6-1, TRBV6-2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6. El dominio variable de cadena alfa de TCR comprende un producto génico de TRAV12-2. Como alternativa, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende un producto génico de TRAV21.

El dominio variable de cadena alfa y el dominio variable de cadena beta pueden presentarse como una única cadena polipeptídica.

Los TCR se presentan en partículas y pueden comprender un enlace disulfuro nativo o no nativo entre una región constante de la cadena alfa y una región constante de la cadena beta. Dichos enlaces disulfuro no nativos se

describen, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Cuando un TCR presentado en una partícula de la biblioteca comprende un dominio constante de región 1, los TCR pueden comprender un enlace disulfuro nativo entre una región constante de la cadena alfa y una región constante de la cadena beta.

5 Cada cadena alfa y cada cadena beta pueden comprender un dominio de dimerización, que es preferentemente heterólogo. Dicho dominio heterólogo puede ser una cremallera de leucina, un dominio 5H3 o contradominios ricos en prolina hidrófobos u otras modalidades similares, como se conoce en la técnica.

Las partículas que forman la biblioteca pueden ser partículas de fago.

10 Como alternativa, la biblioteca puede ser una biblioteca de ribosomas. Como alternativa, la biblioteca puede ser una biblioteca de presentación en levadura, de modo que las partículas pueden ser células de levadura. Como alternativa, la biblioteca puede ser una biblioteca de células de mamífero.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) aislado no natural que comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende un producto génico de TRAV12-2 o un producto génico de TRAV21 y un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende un producto génico de TRBV6 obtenido de una biblioteca del segundo aspecto de la invención.

20 El producto génico de TRBV6 de dicho TCR puede ser un producto génico de TRBV6-1, TRBV6-2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6. El TCR es preferentemente soluble. La invención también abarca un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena alfa de TCR y/o un dominio variable de cadena beta de TCR.

25 Como un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una biblioteca del primer o segundo aspecto, para identificar un TCR que se une específicamente a un antígeno peptídico. El antígeno peptídico puede usarse para explorar la biblioteca de la invención para encontrar un TCR al que se une.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para obtener un receptor de linfocitos T que se une específicamente a un antígeno peptídico, que comprende explorar la biblioteca del primer o segundo aspecto con el antígeno peptídico, comprendiendo el método: a) seleccionar de la biblioteca utilizando como diana el antígeno peptídico; repetir la etapa a) una o más veces; c) explorar los clones de fagos identificados en la etapa a) o b); y d) identificar un TCR que se une específicamente al antígeno peptídico.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para realizar una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, comprendiendo el método: i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21; ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6; iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión; iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos.

45 Se proporciona un método adicional de la invención para realizar una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, comprendiendo el método: i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 utilizando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21; ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6 utilizando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena beta de TRBV6 iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión; iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos con los que dichos cebadores hibridan.

55 Se puede diseñar un cebador directo para hibridar con el locus de TRAV12-2, el locus de TRAV21 o el locus de TRBV6. Se puede diseñar un cebador inverso para hibridar, al menos en parte, con la región constante alfa o beta, respectivamente, de modo que el producto de PCR resultante contiene las regiones variables, hasta las regiones de unión y al menos parte de la región constante. Los acontecimientos de transcripción, traducción o postraducción pueden dar como resultado el truncamiento o la supresión de algunas o todas las regiones de unión y/o constante, incluyendo la región de diversidad en el caso de las secuencias de la cadena beta.

60 En algunos casos, pueden introducirse mutaciones no naturales a los ácidos nucleicos antes de la etapa iii). Las mutaciones pueden introducirse después de la etapa i) y/o ii).

65 Los dominios variables de cadena beta de TRBV6 pueden ser dominios variables de cadena beta de TRBV6-1, TRBV6-

2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6.

En cualquiera de los métodos para realizar una biblioteca de la invención, el dominio variable de cadena alfa de TCR y el dominio variable de cadena beta de TCR se expresan preferentemente como un polipéptido de cadena sencilla, es decir, los ácidos nucleicos que codifican cada uno de los dominios variables de cadena alfa y beta se clonan en el mismo vector.

La invención proporciona como un aspecto adicional un método para obtener un receptor de linfocitos T que se une específicamente a un antígeno peptídico, que comprende explorar una biblioteca del primer o segundo aspecto de la invención con el antígeno peptídico.

Una partícula que presenta en su superficie un TCR de acuerdo con la invención también se incluye en el alcance de la presente invención. La partícula puede ser un fago, un ribosoma, una célula de levadura o una célula de mamífero.

La biblioteca de la invención es de origen no natural, ya que incluye TCR que no son de origen natural o los que se considerarían "aislados" como se usa ese término en el presente documento; y, en consecuencia, los TCR de la invención son, de forma similar, materia objeto elegible para patente, ya que dichos TCR no son de origen natural o los que se considerarían "aislados" como se usa ese término en el presente documento. De forma similar, las células y partículas de la invención son materia elegible para patente porque al presentar en su superficie o expresar un TCR de la invención, la célula o partícula no es de origen natural o lo que se consideraría "aislado" como se usa ese término en el presente documento.

También se observa que en la presente divulgación y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, expresiones tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado habitual que se le atribuye; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares; y que expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado generalmente atribuido a ellos, por ejemplo, permiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se divulgan o son evidentes a partir de y están abarcadas por, la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero no se pretende que limite la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, se puede entender mejor junto con los dibujos adjuntos, en donde:

la Figura 1 describe la estrategia de clonación utilizada para la creación de bibliotecas;

la Figura 2 detalla las secuencias de cebadores utilizadas en la creación de bibliotecas;

la Figura 3 muestra resultados de la exploración por ELISA de una biblioteca de TRAV12.2/21 TRBV 6* agrupada seleccionada con 4 antígenos peptídicos de HLA diferentes. CMV indica antígeno de control negativo;

la Figura 4 muestra los resultados de la exploración por ELISA de una biblioteca de TRAV12.2/21 TRBV 6* agrupada preparada a partir de un único donante negativo HLA-A2/A24 y seleccionada con 3 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo;

la Figura 5 muestra los resultados de la exploración por ELISA de bibliotecas de TRAV12.2 TRBV 6* / TRAV21 TRBV 6* individuales seleccionadas con 2 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo;

la Figura 6 muestra los resultados de la exploración por ELISA de bibliotecas de TRAV12.2 TRBV 6* / TRAV21 TRBV 6* individuales preparadas a partir de una fuente de ARNm comercial y seleccionadas con 2 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo;

la Figura 7 muestra ensayos de especificidad adicionales de TCR aislados de una biblioteca de la invención; y

la Figura 8 muestra curvas de unión de Biacore para versiones solubles de TCR específicos de antígeno aislados de una biblioteca de la invención.

Según la invención, se proporciona una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de receptores de linfocitos T (TCR) diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden una cadena alfa que comprende un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y una cadena beta que comprende un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un TRAV12-2 o un producto génico de TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6.

5 Por "que consistente esencialmente en" se entiende que la mayoría de los TCR en la biblioteca comprenden TRAV12-2 o TRAV21 y TRBV6, pero que la minoría puede comprender diferentes dominios variables de cadena alfa o beta debido a la hibridación no específica de cebadores al realizar la biblioteca, o regiones de alta homología entre genes en los genes de loci variables alfa o beta. La cantidad de la mayoría puede definirse como a continuación.

10 La pluralidad de TCR puede consistir en 80 % de TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa que comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y un dominio variable de cadena beta que comprende un producto génico de TRBV6. La pluralidad de TCR puede consistir en 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de los TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa que comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y un dominio variable de cadena beta que comprende un producto génico de TRBV6.

15 El 20 % restante o menos de la pluralidad de TCR puede comprender diferentes productos génicos de dominio variable de cadena alfa combinados con productos génicos de dominio variable de cadena beta de TRBV6, diferentes productos génicos de dominio variable de cadena beta combinados con productos génicos de dominio variable de TRAV12-2 o TRAV21 o cadenas truncadas/no productivas.

20 Por tanto, en algunas realizaciones, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende un producto génico de TRAV12-2 y, en otras realizaciones, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende un producto génico de TRAV21. La biblioteca puede incluir una pluralidad de TCR en donde una parte de los TCR comprende un producto génico de TRAV12-2 y una parte de los TCR comprende un producto génico de TRAV21.

25 Por lo tanto, la biblioteca de la presente invención puede contener una pluralidad de TCR que tienen cada uno el siguiente uso de genes de cadena alfa y cadena beta V, J, (D) y C:

30 cadena alfa - TRAV21/TRAJxx/TRAC; o
 cadena alfa - TRAV12-2/TRAJxx/TRAC; y
 cadena beta - TRBV6-y/TRBDx/TRBJxx/TRBC1, TRBC2 o una quimera de C1 y C2, en donde xx es cualquiera de los 61 genes alfa J o 13 genes beta J, respectivamente, y Dx representa cualquiera de los 2 genes beta D. TRBV6-y indica que el alelo TRBV6 que se utiliza puede variar.

El producto génico de TRBV puede ser un producto génico TRBV6-1, TRBV6-2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6.

35 Como se ha analizado anteriormente, las regiones J, D o C pueden estar cada una presentes total o parcialmente o ausentes.

40 Por "de un repertorio natural" se entiende que los dominios variables de las cadenas alfa y beta de TCR se expresan a partir de secuencias de ADN que se han obtenido de donantes humanos. En otras palabras, la diversidad de los dominios variables alfa y beta de los TCR de la biblioteca se ha generado de forma natural durante el desarrollo de linfocitos T *in vivo*. Asimismo, esto significa que las secuencias de todas las cadenas alfa y beta en la biblioteca se habrán seleccionado durante la selección tímica. La combinación aleatoria de estas cadenas alfa y beta, que se produce durante la creación de la biblioteca, puede dar como resultado un repertorio alternativo de combinaciones de cadenas alfa beta en comparación con el presente originalmente *in vivo* (es decir, en el donante o los donantes). Las secuencias de ADN pueden obtenerse indirectamente, por ejemplo, produciendo ADNc a partir de ARNm de donante. Las secuencias de ADNc pueden usarse después como moldes para producir secuencias de ADN a partir de las cuales se produce la pluralidad de TCR diferentes.

50 Por producto génico se entiende un polipéptido, que puede incluir modificaciones postraduccionales, que está codificado por la secuencia de ácido nucleico del gen indicado. Como conocen los expertos en la materia, cada gen de dominio variable de cadena alfa o beta de TCR contiene variación en las regiones CDR3, como se ha analizado anteriormente, lo que significa que los productos genéticos también variarán enormemente.

55 La biblioteca de la presente invención comprende preferentemente al menos 1×10^8 partículas que presentan una combinación de cadena $\alpha\beta$ de TCR.

La biblioteca puede ser una biblioteca de partículas de fago. La presentación en fagos se describe en el documento WO 2004/044004.

60 Como alternativa, la biblioteca es una biblioteca de ribosomas. La presentación en ribosomas es conocida en la técnica. Las partículas pueden ser complejos ribosómicos completos o partes de los mismos.

65 Se pueden utilizar sistemas de presentación en levadura, lo que significa que la biblioteca puede ser una biblioteca de células de levadura.

Una metodología de presentación adicional adecuada para la creación de bibliotecas de TCR es la presentación en

células de mamífero. Este sistema utiliza un vector retrovívico para introducir las cadenas alfa y beta de TCR en un hibridoma de linfocitos T TCR negativo. El método se describe adicionalmente en Chervin *et al.* (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84; y Kessels *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14578-83).

- 5 Cualquier biblioteca de partículas que sea capaz de presentar TCR heterodiméricos o de cadena sencilla, como se ha descrito, está abarcada por la invención.

El dominio constante de la cadena alfa y/o beta puede truncarse en relación con las secuencias de TRAV/TRBV nativas/de origen natural. Además, cuando están presentes, el TRAC/TRBC puede contener modificaciones. La secuencia extracelular de la cadena alfa puede incluir una modificación en relación con el TRAC nativo/de origen natural por el cual el aminoácido T48 de TRAC, en referencia a la numeración de IMGT, se reemplaza con C48. Análogamente, la secuencia extracelular de la cadena beta puede incluir una modificación en relación con el TRBC1 o TRBC2 nativo/de origen natural por el cual S57 de TRBC1 o TRBC2, en referencia a la numeración de IMGT, se reemplaza con C57 y C75 se reemplaza por A75 y N89 reemplaza D89. Estas sustituciones de cisteína en relación con las secuencias extracelulares de las cadenas alfa y beta nativas permiten la formación de un enlace disulfuro intercatenario no nativo que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado por replegamiento de cadenas alfa y beta extracelulares. Este enlace disulfuro no nativo facilita la presentación de TCR plegados correctamente en fagos. (Li, Y., *et al.* *Nat Biotechnol* 2005: 23(3), 349-54). Además, el uso del TCR soluble unido por disulfuro estable permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y la semivida de unión. Se describen sustituciones alternativas en el documento WO03/020763. Como alternativa, los dominios constantes alfa y beta pueden estar unidos por un enlace disulfuro que corresponde al que se encuentra en la naturaleza.

Para estabilizar adicionalmente, o como alternativa, los TCR heterodiméricos, cada cadena alfa y cada cadena beta pueden comprender un dominio de dimerización, que puede ser heterólogo de la secuencia de la cadena de TCR nativa.

En particular, el dominio de dimerización puede ser una cremallera de leucina. Esta expresión describe pares de péptidos helicoidales que interactúan entre sí de una manera específica para formar un heterodímero. La interacción se produce porque hay restos hidrófobos complementarios a lo largo de un lado de cada péptido de cremallera. La naturaleza de los péptidos es tal que la formación de heterodímeros es mucho más favorable que la formación de homodímeros de las hélices. Las cremalleras de leucina pueden ser sintéticas o de origen natural, tales como las descritas en el documento WO99/60120. Los dominios de dimerización alternativos incluyen elementos formadores de enlaces disulfuro. Como alternativa, puede ser proporcionado por los dominios SH3 y contradominios hidrófobos/ricos en prolina, que son responsables de las interacciones proteína-proteína observadas entre proteínas implicadas en la transducción de señales (revisado por Schlessinger, (Schlessinger, J., *Curr Opin Genet Dev.* febrero de 1994; 4(1):25-30). Otras interacciones proteína-proteína naturales encontradas entre proteínas que participan en cascadas de transducción de señales se basan en asociaciones entre aminoácidos modificados postraduccionalmente y módulos de proteínas que reconocen específicamente dichos restos modificados. Dichos módulos de aminoácidos y proteínas modificados postraduccionalmente pueden formar el dominio de dimerización de las cadenas de TCR de la biblioteca de acuerdo con la invención.

Sin quedar ligado a teoría alguna, el tamaño de la biblioteca de la presente invención, es decir, el número reducido de genes de dominio variable de cadena alfa y beta que están representados en el mismo en relación con un repertorio completo (o casi completo), se cree que es una posible razón por la cual los TCR funcionales específicos pueden identificarse a partir de la biblioteca de la invención. En las bibliotecas "naturales" mayores descritas anteriormente, puede ser que determinadas cadenas alfa no se emparejen con determinadas cadenas beta y, por tanto, gran parte de la biblioteca no es funcional. Es posible que determinados tipos de cadenas no se plieguen correctamente en la superficie del fago. Puede ser que cada cadena alfa no se exprese o presente con la frecuencia suficiente para ser emparejada con la cadena beta "ideal", y viceversa, y por tanto reducir las posibilidades de identificar un TCR funcional específico que comprende una cadena alfa y beta. Asimismo, puede ser que determinadas secuencias de cadena alfa o beta sean dominantes y, por lo tanto, actúen para 'envenenar' la biblioteca.

La presente invención también proporciona una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6 y en donde al menos una parte de los TCR comprende un dominio variable de cadena alfa y/o un dominio variable de cadena beta que comprende una mutación no natural.

Se pueden introducir mutaciones no naturales de cualquier manera conocida en la técnica. Las mutaciones no naturales pueden generarse aleatoriamente o definirse específicamente, o ambas. Por ejemplo, las mutaciones generadas aleatoriamente pueden incorporarse en posiciones definidas usando mutagénesis de saturación de sitio en la que la secuencia codificante de aminoácidos nativa se reemplaza por la secuencia codificante de todos los otros aminoácidos de origen natural; de este modo, creando diversidad de biblioteca adicional en una posición definida. El método puede implicar replicar el ADN de interés usando amplificación por PCR con oligonucleótidos sintéticos degradados como cebadores. Como alternativa, o además, se pueden introducir mutaciones definidas, incluyendo

inserciones y eliminaciones, en determinadas posiciones utilizando, por ejemplo, kits disponibles en el mercado, tales como el Kit de Mutagénesis Dirigida Quik Change de Stratagene. Preferentemente, Se incorporan mutaciones no naturales en las regiones CDR.

5 La biblioteca puede mostrar TCR donde 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de los dominios variables de cadena alfa o los dominios variables de cadena beta comprenden una mutación no natural.

10 Como un aspecto adicional, la invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) aislado que comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende un producto génico de TRBV6 aislado de una biblioteca según el segundo aspecto de la invención.

15 Por aislado se entiende que el TCR se elimina de su ambiente natural, es decir, no un TCR que se presenta de forma natural en un linfocito T *in vivo*.

20 El TCR puede unirse específicamente a un antígeno peptídico. Dicho TCR obtenido de la biblioteca de la invención puede unirse con fuerte afinidad y alta especificidad al antígeno peptídico, determinado por, por ejemplo, pero sin limitación, ELISA o BiaCore. El TCR puede tomarse mediante maduración de afinidad adicional de modo que aumente la afinidad de unión y/o semivida. El TCR puede ser soluble, es decir, puede escindirse del dominio transmembrana, tal como se describe en el documento WO 03/020763. El TCR puede contener un enlace disulfuro no nativo como se ha descrito anteriormente. El TCR puede fusionarse con marcadores detectables incluyendo, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste, o con agentes terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, inmunomoduladores, compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (cis-platino, por ejemplo) (documento WO2010/133828). El TCR puede expresarse de forma no natural en la superficie de las células, preferentemente células de mamífero, más preferentemente células inmunitarias, aún más preferentemente linfocitos T.

30 La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio K_D) y semivida de unión (expresada como $T_{1/2}$) pueden determinarse mediante cualquier método apropiado. Se apreciará que, al duplicar la afinidad de un TCR, 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 tanto, al duplicar la $T_{1/2}$, la k_{off} se reduce a la mitad. Los valores de K_D y k_{off} para TCR se miden habitualmente para formas solubles del TCR, es decir, las formas que se truncan para eliminar restos hidrófobos del dominio transmembrana. Por lo tanto, debe entenderse que un TCR dado cumple el requisito de tener una afinidad de unión por y/o una semivida de unión para un antígeno peptídico si una forma soluble de ese TCR cumple ese requisito. Preferentemente, la afinidad de unión o semivida de unión de un TCR dado se mide varias veces, a una temperatura definida usando el mismo protocolo de ensayo y se toma un promedio de los resultados. Más preferentemente, la afinidad de unión o semivida de unión se mide por resonancia de plasmón superficial a una temperatura de 25 °C. Se proporciona un método preferido en el Ejemplo 10.

40 Para los fines de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, un TCR es un resto que tiene al menos un dominio variable alfa de TCR y al menos un dominio variable beta de TCR. En general, comprenderá un dominio variable alfa de TCR y un dominio variable beta de TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ o pueden ser de formato de cadena sencilla, por lo que se entiende que un único polipéptido contiene tanto la cadena alfa como la cadena beta, tal como se describe en el documento WO 2004/033685. Como alternativa, el TCR puede comprender un dominio extracelular de la cadena α de TCR dimerizado con un dominio extracelular de la cadena β de TCR por medio de un par de péptidos de dimerización C-terminal, tales como cremalleras de leucina, dichos TCR se describen en el documento WO 99/60120. Para su uso en terapia adoptiva, un TCR $\alpha\beta$ heterodimérico puede, por ejemplo, transfectarse en células, tales como linfocitos T, como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplasmáticos como transmembrana. Si se desea, puede estar presente un enlace disulfuro introducido entre restos de los respectivos dominios constantes (véase, por ejemplo, documento WO 2006/000830). Como alternativa, los dominios constantes alfa y beta pueden estar unidos por un enlace disulfuro que corresponde al que se encuentra en la naturaleza.

55 Es importante señalar que, cualquiera que sea el formato, los TCR de la biblioteca del primer aspecto de la invención son, en lo que respecta a los dominios variables alfa y beta, procedentes de secuencias de origen natural que no se han modificado o mutado con referencia al ARNm donante que actúa como el molde para generar el ADNc a partir del que se amplifica la cadena de TCR.

60 Se incluye en la invención un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena alfa de TCR y/o un dominio variable de cadena beta de TCR del TCR de la invención. Las cadenas alfa y beta pueden expresarse a partir de ácidos nucleicos separados o de una molécula de ácido nucleico. Si son de la misma molécula de ácido nucleico, las cadenas alfa y beta pueden expresarse como polipéptidos independientes o como una sola cadena.

65 El ácido nucleico comprende una secuencia de TRAV12-2 o TRAV21 y/o una secuencia de ácido nucleico de TRBV6. El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de TRAJ y/o una secuencia de TRBD/TRBJ. El ácido

nucleico también puede comprender la secuencia de ácido nucleico de TRAC y/o TRBC1 o TRBC2, o secuencias parciales de la misma.

5 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de la biblioteca del primer o segundo aspecto para identificar un TCR que se une específicamente a un antígeno peptídico. Como se ha mencionado, los TCR que se unen específicamente a un antígeno peptídico son deseables por una variedad de razones.

10 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para realizar una biblioteca según el primer aspecto de la invención. El método comprende: i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa TRAV12-2 o TRAV21; ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6; iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión; iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos.

15 Los ácidos nucleicos pueden obtenerse mediante PCR o construirse sintéticamente, por ejemplo usando síntesis de ADN en fase sólida, tal como se lleva a cabo comercialmente por Life Technologies. Los ácidos nucleicos de i) y ii) pueden obtenerse copiando/amplificando la secuencia de nucleótidos trans ADNc, que se ha realizado a partir de ARNm del repertorio de linfocitos T de un donante. Los ácidos nucleicos que se obtienen que codifican diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 o beta de TRBV6 pueden ser los únicos ácidos nucleicos obtenidos, es decir, la etapa i) puede implicar obtener solo ácidos nucleicos que codifican diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 y la etapa ii) puede implicar obtener solo ácidos nucleicos que codifican diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6. La biblioteca generada puede ser una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6.

20 La invención también proporciona un método para realizar una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, comprendiendo el método: i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 utilizando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21; ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6 usando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena beta de TRBV6; iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión; iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos con los que dichos cebadores hibridan.

25 Dos secuencias monocatenarias se hibridarán entre sí, incluso si no hay una identidad de secuencia del 100 % entre las dos secuencias, dependiendo de las condiciones en las cuales se produce la reacción de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación.

30 En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Mg^{2+}) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación. La alta rigurosidad, tal como alta temperatura de hibridación y baja sal en tampones de hibridación, permite solo la hibridación entre secuencias de ácido nucleico que son muy similares, mientras que la baja rigurosidad, tal como baja temperatura y alta sal, permite la hibridación cuando las secuencias son menos similares. El experto en la materia puede llevar a cabo fácilmente cálculos con respecto a las condiciones de hibridación para alcanzar ciertos grados de rigurosidad y estos se analizan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11). La persona experta podrá optimizar las condiciones de hibridación según los resultados de los ensayos de sensibilidad y especificidad.

35 40 45 50 55 Lo siguiente es un conjunto ilustrativo de condiciones de hibridación para su uso en la presente invención:

ES 2 740 930 T3

Muy alta rigurosidad (detecta secuencias que comparten al menos 90 % de identidad)
Hibridación: SSC 5x a 65 °C durante 16 horas
Lavar dos veces: SSC 2x a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos cada uno
Lavar dos veces: SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada uno

Alta rigurosidad (detecta secuencias que comparten al menos 80 % de identidad)
Hibridación: SSC 5x-6x a 65 °C-70 °C durante 16-20 horas
Lavar dos veces: SSC 2x a TA durante 5-20 minutos cada uno
Lavar dos veces: SSC 1x a 55 °C-70 °C durante 30 minutos cada uno

5 Baja rigurosidad (detecta secuencias que comparten al menos 50 % de identidad)
Hibridación: SSC 6x de TA a 55 °C durante 16-20 horas
Lavar al menos dos veces: SSC 2x-3x de TA a 55 °C durante 20-30 minutos cada uno

Los cebadores desvelados en el presente documento pueden hibridarse con los ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de cadena alfa de TRAV12 o TRAV21 o los dominios variables de cadena beta de TRBV6 en condiciones de baja rigurosidad, alta rigurosidad y muy alta rigurosidad.

El cebador puede unirse con alta rigurosidad a las secuencias que codifican los dominios variables de cadena alfa y beta. Sin embargo, los cebadores pueden unirse a otros loci que tienen una alta homología con TRAV12-2, TRAV21 y/o TRVB6.

El ácido nucleico que codifica TRBV6 de ambos métodos puede ser un TRBV6-1, un producto génico de TRBV6-2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6.

Los ácidos nucleicos de las etapas i) y ii) son de un repertorio natural. Se pueden introducir mutaciones no naturales en los dominios variables alfa o beta, antes de la etapa iii) o después de la etapa iii), es decir, las secuencias de ácido nucleico pueden tener mutaciones no naturales introducidas antes de ser clonadas en vectores. Como alternativa, las mutaciones no naturales pueden introducirse después de las etapas de clonación de iii) y/o iv).

La amplificación de los dominios variables de TRAV12-2 o TRAV21 puede ser a partir de una biblioteca de ADNc preparada previamente, que a su vez procede de ARNm donante, con un cebador directo diseñado para unirse específicamente al locus de interés. El cebador inverso puede estar diseñado para unirse específicamente (al menos parcialmente) a la región constante alfa de TCR, de modo que el producto de PCR resultante contiene la secuencia de ácido nucleico de TRAV12-2 o TRAV21, la región de unión y al menos parte de la región constante. Dicho diseño de cebador asegura que se captura la variedad y diversidad de la región CDR3 del dominio variable de cadena alfa, lo que da como resultado un gran número de secuencias de cadena alfa de TCR únicas que se representan en la biblioteca de la invención. Preferentemente, el donante es humano.

Análogamente, la amplificación del dominio variable de TRBV6 puede ser a partir de una biblioteca de ADNc disponible, con un cebador directo diseñado para unirse específicamente al locus de interés. El cebador inverso puede estar diseñado para unirse específicamente a la región constante beta de TCR, de modo que el producto de PCR resultante contiene una secuencia de ácido nucleico de TRBV6, la región de unión (que contiene los loci D y J) y al menos parte de la región constante. Dicho diseño de cebador asegura que se captura la variedad y diversidad de la región CDR3 del dominio variable de cadena beta, lo que da como resultado un gran número de secuencias de cadena beta de TCR únicas que se representan en la biblioteca de la invención.

El ARNm se obtiene de al menos un donante. Por "al menos un donante" se entiende que la secuencia polipeptídica del dominio variable de cadena alfa o beta es sustancialmente como aparecería de forma natural en un linfocito T del donante del que se obtiene el ARNm.

Los productos de PCR resultantes pueden ligarse en un vector de fago directamente si contienen las secuencias de genes constantes completas, siempre que las secuencias de ligamiento o recombinación necesarias estén presentes en las secuencias de vector y cebador. Como alternativa, los productos de PCR alfa y beta se pueden unir con secuencias que contienen la secuencia del gen de dominio constante alfa y la secuencia del gen de dominio constante beta respectivamente, para obtener secuencias de cadena de TCR completas. La cadena alfa y la cadena beta se pueden unir aleatoriamente para aumentar la diversidad en la biblioteca de fagos. Las secuencias completas se pueden clonar en un vector de fago, para expresarse como un marco abierto de lectura (como se muestra en la Figura 1).

Como alternativa, también se pueden usar otros formatos de presentación de partículas para producir las bibliotecas de la invención. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia y pueden incluir, pero sin limitación,

presentar en partículas ribosómicas o células de levadura.

Estos métodos de presentación se dividen en dos grandes categorías, presentación *in vitro* e *in vivo*.

5 Todos los métodos de presentación *in vivo* dependen de una etapa en la que la biblioteca, habitualmente codificada en o con el ácido nucleico genético de una partícula replicable, tal como un plásmido o replicón de fago, se transforma en células para permitir la expresión de las proteínas o polipéptidos. (Plückthun (2001) Adv Protein Chem 55 367-403). Existen varios sistemas replicón/hospedador que han demostrado ser adecuados para presentación *in vivo* de proteínas o polipéptidos. Estos incluyen los siguientes:

10

Fago/células bacterianas
plásmido/células CHO
Vectores basados en el plásmido de levadura de 2 µm/células de levadura
baculovirus/células de insecto

15

plásmido/células bacterianas
vector retroviral/células de mamífero

20 Los métodos de presentación *in vivo* incluyen métodos de presentación en superficie celular en los que se introduce un plásmido en la célula hospedadora que codifica una proteína de fusión que consiste en la proteína o el polipéptido de interés fusionado con una proteína o un polipéptido de la superficie celular. La expresión de esta proteína de fusión conduce a que la proteína o el polipéptido de interés se presente en la superficie de la célula. Las células que presentan estas proteínas o polipéptidos de interés pueden someterse después a un proceso de selección tal como FACS y los plásmidos obtenidos de la célula o células seleccionadas pueden aislarse y secuenciarse. Se han ideado sistemas de presentación en superficie celular para células de mamífero (Higuschi (1997) J Immunol. Métodos 202 193-204),
25 células de levadura (Shusta (1999) J Mol Biol 292 949-956) y células bacterianas (Sameulson (2002) J. Biotechnol 96 (2) 129-154). La presentación de TCR de cadena sencilla en la superficie de células de levadura se conoce en la técnica (documento WO01/48145)

30 Se han publicado numerosas revisiones de las diversas técnicas de presentación *in vivo*. Por ejemplo, (Hudson (2002) Expert Opin Biol Ther (2001) 1 (5) 845-55) y (Schmitz (2000) 21 (Sup A) S106-S112).

35 Los métodos de presentación *in vitro* se basan en el uso de ribosomas para traducir bibliotecas de ARNm en una serie diversa de variantes de proteínas o polipéptidos. El enlace entre las proteínas o polipéptidos formados y el ARNm que codifica estas moléculas se mantiene mediante uno de dos métodos. La presentación convencional en ribosomas utiliza secuencias de ARNm que codifican una secuencia conectora corta (normalmente de 40-100 aminoácidos) y la proteína o el polipéptido para presentar. Las secuencias conectoras permiten que la proteína o el polipéptido presentado tenga suficiente espacio para replegarse sin estar impedido estéricamente por el ribosoma. La secuencia de ARNm carece de un codón de 'terminación', lo que asegura que la proteína o el polipéptido expresados y el ARN permanezcan unidos a la partícula ribosómica. El método de presentación de ARNm relacionado se basa en la
40 preparación de secuencias de ARNm que codifican la proteína o el polipéptido de interés y conectores de ADN que portan un resto de puromicina. Tan pronto como el ribosoma alcanza la unión de ARNm/ADN, la traducción se detiene y la puromicina forma un enlace covalente con el ribosoma. Para una revisión de estos dos métodos de presentación *in vitro* relacionados, véase (Amstutz (2001) Curr Opin Biotechnol 12 400-405).

45 Se prefiere en particular la técnica de presentación en fagos que se basa en la capacidad de las partículas de bacteriófagos para expresar un péptido o polipéptido heterólogo fusionado con sus proteínas de superficie (Smith (1985) Science 217 1315-1317). El procedimiento es bastante general y se entiende bien en la técnica para la presentación de monómeros polipeptídicos. La presentación de proteínas dimericas tales como TCR heterodiméricos también está bien establecida en la técnica (documento WO04/044004)

50

Existen dos procedimientos principales que se aplican a la presentación tanto monomérica como dimerica: En primer lugar (Método A) insertando en un vector (fagémido) ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo fusionado con el ADN que codifica una proteína de cubierta de bacteriófago (por ejemplo, ADN que codifica las proteínas P3 o P8). La expresión de partículas de fago que presentan el péptido o polipéptido heterólogo se lleva a cabo transfectando
55 células bacterianas con el fagémido y después infectando las células transformadas con un 'fago auxiliar'. El fago auxiliar actúa como una fuente de las proteínas de fago no codificadas por el fagémido necesarias para producir una partícula de fago funcional.

60 En segundo lugar (Método B), insertando ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo en un genoma completo del fago fusionado con el ADN que codifica una proteína de cubierta de bacteriófago. La expresión de partículas de fago que presentan el péptido o polipéptido heterólogo se lleva a cabo después infectando células bacterianas con el genoma del fago. Este método tiene la ventaja del primer método de ser un proceso de 'una única etapa'. Sin embargo, se reduce el tamaño de la secuencia de ADN heterólogo que puede empaquetarse con éxito en las partículas de fago resultantes. M13, T7 y Lambda son ejemplos de fagos adecuados para este método.

65

Una variación del (Método B) implica añadir una secuencia de ADN que codifica un dominio de unión a nucleótidos al

ADN en el genoma del fago que codifica el péptido heterólogo para presentar y añadir además el sitio de unión a nucleótidos correspondiente al genoma del fago. Esto hace que el péptido heterólogo se una directamente al genoma del fago. Este complejo de péptido/genoma se empaqueta después en una partícula de fago que presenta el péptido heterólogo. Este método se describe completamente en el documento WO 99/11785.

Las partículas de fago pueden después recuperarse y usarse para estudiar las características de unión del péptido o polipéptido heterólogo. Una vez aislado, el ADN de fagémido o fago se puede recuperar de la partícula de fago que presenta el péptido o polipéptido y este ADN se puede replicar mediante PCR. El producto de PCR se puede usar para secuenciar el péptido o polipéptido heterólogo presentado por una partícula de fago dada.

La presentación en fagos de anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos se ha convertido en un medio rutinario para estudiar las características de unión de estos polipéptidos. Existen numerosos libros disponibles que revisan técnicas de presentación en fagos y la biología del bacteriófago. (Véase, por ejemplo, Phage Display - A Laboratory Manual, Barbas *et al.*, (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Un tercer método de presentación en fagos (Método C) se basa en el hecho de que los polipéptidos heterólogos que tienen un resto de cisteína en una localización deseada pueden expresarse en forma soluble mediante un genoma de fagémido o fago y hacer que se asocien con una proteína de superficie de fago modificada que también tiene un resto de cisteína en una posición expuesta en superficie, mediante la formación de un enlace disulfuro entre las dos cisteínas. El documento WO 01/05950 detalla el uso de este método de enlace alternativo para la expresión de péptidos procedentes de anticuerpos de cadena sencilla.

Como se ha mencionado anteriormente, los TCR heterodiméricos $\alpha\beta$ de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido (no nativo) entre sus dominios constantes. Esto se puede lograr durante el método de realización de la biblioteca de la invención uniendo la secuencia de ácido nucleico amplificada a una secuencia génica constante modificada. Dichas secuencias pueden incluir las que tienen una secuencia de dominio constante de TRAC y una secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2, excepto que Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2, en referencia a la numeración de IMGT, son reemplazados por restos de cisteína, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante de TRAC y la secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2 de los TCR de la biblioteca.

Con o sin el enlace intercatenario introducido mencionado en el párrafo anterior, los TCR heterodiméricos $\alpha\beta$ de la invención pueden tener una secuencia de dominio constante de TRAC y una secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante de TRAC y la secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar unidas por el enlace disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Como alternativa, el dominio variable de cadena alfa de TCR y el dominio variable de cadena beta de TCR pueden expresarse como un polipéptido de cadena sencilla. Dicha configuración puede incluir un enlace disulfuro no nativo entre residuos de aminoácidos mutados.

La invención también proporciona un método para obtener un receptor de linfocitos T que se une específicamente a un antígeno peptídico, que comprende explorar la biblioteca según el primer o segundo aspectos de la invención con el antígeno peptídico.

La exploración puede incluir una o más etapas como se expone a continuación

- a) selección de la biblioteca utilizando como diana el antígeno peptídico
- b) repetir la etapa a) una o más veces
- c) explorar los clones de fagos identificados en la etapa a) o b)
- d) identificar un TCR que se une específicamente al antígeno peptídico.

De acuerdo con la etapa (b), la etapa (a) puede repetirse una vez, dos veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 6 veces. Se puede repetir hasta 10 veces. La etapa (a) puede repetirse hasta 20 veces o más.

Por selección se entiende que se permite que los clones de fago entren en contacto con un antígeno y los clones de fago unidos se separen de los clones de fago no unidos. Esto puede incluir inmovilizar el antígeno en un soporte sólido tal como tubos, perlas magnéticas, matrices en columnas o chips sensores BiaCore. La unión a antígeno puede estar mediada por adsorción inespecífica o mediante el uso de un marcador de unión específico tal como un antígeno biotinilado y una superficie recubierta de estreptavidina. Un método alternativo puede incluir la selección en células intactas. (Hoogenboom, H. R., *et al* (1998) Immunotechnology, 4(1), 1-20.). Los clones de fagos que no se unen (es decir, fagos que no presentan un TCR que se une al antígeno) se eliminan por lavado. Los clones de fagos unidos pueden después eluirse mediante; escisión enzimática de un sitio de proteasa, tal como tripsina, entre la cadena beta de TCR y el gen III; extremos de pH; o competencia con exceso de antígeno. Estos clones de fagos se pueden someter a ciclos adicionales de selección o a experimentos de exploración para identificar clones con características de unión óptimas.

- La exploración puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante métodos basados en ELISA con antígeno recubierto o células intactas y puede estar en formato de 96 pocillos; cuando se usen células completas, la exploración puede llevarse a cabo utilizando citometría de flujo. Puede llevarse a cabo exploración para determinar la afinidad y la cinética de unión usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, en un instrumento BiaCore o usando una microbalanza de cristal de cuarzo. Se describen métodos de exploración en Pande, J., *et al.* (2010). *Biotechnol Adv* 28 (6): 849-58. Como conocen los expertos en la materia, están disponibles métodos adecuados adicionales para explorar interacciones biomoleculares de este tipo, incluyendo: el sistema Octet de ForteBIO, que utiliza la interferometría de biocapa (BLI) para medir las interacciones biomoleculares en tiempo real y proporcionar información sobre afinidad y cinética; el ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada (por ejemplo, AlphaScreen™) en el que las moléculas potencialmente interactivas están unidas a perlas 'donantes' y 'aceptoras' que tienen propiedades fluorescentes particulares cuando están muy cerca; el ensayo de proximidad de centelleo en el que las interacciones se evalúan mediante la transferencia de partículas beta entre moléculas muy cercanas; otros ensayos de interfaz óptica como se describen en, por ejemplo, el documento WO 2004/044004.
- La especificidad se puede determinar ensayando la unión de TCR identificados a otros péptidos distintos del antígeno peptídico utilizado para explorar la biblioteca. Si se produce unión a otros péptidos, el TCR puede considerarse inespecífico. La especificidad puede evaluarse utilizando los métodos identificados anteriormente.
- El antígeno peptídico puede ser un antígeno conocido, tal como los descritos en Bridgeman, J. S., *et al.* (2012) *Immunology*, 135(1), 9-18. El método de exploración de la biblioteca de la invención también se puede usar con nuevos antígenos peptídicos, con el fin de identificar TCR de unión específica que pueden resultar útiles en áreas terapéuticas.
- Se desvela en el presente documento una célula aislada que presenta en su superficie un TCR según la invención, es decir, un receptor de linfocitos T (TCR) aislado que comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende un producto génico de TRAV12-2 o un producto génico de TRAV21 y un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende un producto génico de TRBV6 obtenido de una biblioteca del primer o segundo aspecto de la invención, en donde el TCR se une específicamente a un antígeno peptídico. La célula puede ser un linfocito T. La célula puede ser una célula humana, murina u otra célula animal.
- Existen varios métodos adecuados para la transfección a linfocitos T de ADN o ARN que codifican los TCR de la invención. (Véase, por ejemplo, Robbins *et al.*, (2008) *J. Immunol.* 180: 6116-6131). Los linfocitos T que expresan los TCR de la invención serán adecuados para su uso en el tratamiento basado en terapia adoptiva de enfermedades tales como cánceres, infecciones víricas, enfermedades autoinmunitarias, infecciones parasitarias e infecciones bacterianas. Como conocerán los expertos en la materia, existen varios métodos adecuados mediante los cuales se puede llevar a cabo la terapia adoptiva. (Véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, (2008) *Nat Rev Cancer* 8 (4): 299-308).
- Para su uso en terapia adoptiva, la invención también incluye células que albergan un vector de expresión de TCR que comprende ácido nucleico que codifica el TCR de la invención en un único marco de lectura abierto o dos marcos de lectura abiertos distintos. También se describen células que albergan un primer vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa de un TCR de la invención y un segundo vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena beta de un TCR de la invención. Como alternativa, un vector puede expresar tanto una cadena alfa como una cadena beta de un TCR de la invención.
- Los TCR de la invención destinados al uso en terapia adoptiva pueden estar glucosilados cuando son expresados por los linfocitos T transfectados. Como es bien sabido, el patrón de glucosilación de TCR transfectados puede modificarse mediante mutaciones del gen transfectado (Kuball J *et al.* (2009), *J Exp Med* 206(2):463-475).
- Para la administración a pacientes, los linfocitos T transfectados con TCR de la invención pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las células de acuerdo con la invención habitualmente se suministrarán 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 deseado de administración a un paciente). Esta puede proporcionarse en una forma farmacéutica unitaria, en general se proporcionará en un recipiente sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluiría instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias. Los expertos en la materia conocen composiciones y métodos de administración adecuados, por ejemplo, véase Johnson *et al.* *Blood* (114):535-46 (2009), en referencia a ensayos clínicos números NCI-07-C-0175 y NCI-07-C-0174.
- La composición farmacéutica se puede adaptar para administración por cualquier vía adecuada tal como una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenoso o intraperitoneal), de inhalación u oral. 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.
- Las dosificaciones de las sustancias de la presente invención pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o el trastorno para tratar, tal como cáncer, infección vírica, enfermedad autoinmunitaria, infección

bacteriana o infección parasitaria, la edad y la condición del individuo para tratar, etc. Por ejemplo, un intervalo de dosis adecuado para un reactivo ImmTAC (un TCR soluble fusionado con un dominio anti-CD3) puede ser entre 25 ng/kg y 50 µg/kg. Un médico determinará en última instancia las dosificaciones adecuadas para utilizar.

5 Los TCR de las invenciones también pueden marcarse con un compuesto de captura de imágenes, por ejemplo, un marcador que es adecuado para fines de diagnóstico. Dichos TCR de alta afinidad marcados son útiles en un método para detectar un ligando de TCR seleccionado de complejos de CD1-antígeno, superantígenos bacterianos y complejos de MHC-péptido/superantígeno, comprendiendo dicho método poner en contacto el ligando de TCR con un TCR de alta afinidad (o un complejo de TCR de alta afinidad multimérico) que es específico del ligando de TCR; y
10 detectar la unión al ligando de TCR. En complejos de TCR de alta afinidad tetraméricos (formados, por ejemplo, usando heterodímeros biotilados) puede usarse estreptavidina fluorescente (disponible en el mercado) para proporcionar un marcador detectable. Dicho tetrámero marcado con fluorescencia es adecuado para su uso en el análisis por FACS, por ejemplo, para detectar células presentadoras de antígeno que portan el péptido para el que el TCR de alta afinidad es específico.

15 Como alternativa o adicionalmente, un TCR (o complejo multivalente del mismo) de alta afinidad puede estar asociado (por ejemplo, unido covalentemente o de otra forma) con un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un resto tóxico para su uso en la destrucción celular o un agente inmunoestimulante tal como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR de alta afinidad multivalente de la presente invención puede tener capacidad de unión potenciada para un ligando de TCR en comparación con un heterodímero de receptor de linfocitos T de alta afinidad o de tipo silvestre no multimérico. Por tanto, los complejos de TCR de alta afinidad multivalentes según la invención son particularmente útiles para seguir o dirigirse a células que presentan antígenos particulares *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermedios para la producción de complejos de TCR de alta afinidad multivalentes que tienen dichos usos. El TCR de alta afinidad o complejo de TCR de alta afinidad multivalente puede proporcionarse, por lo tanto, en
20 una formulación farmacéuticamente aceptable para su uso *in vivo*.

Pueden usarse TCR de alta afinidad de la invención en la producción de reactivos biespecíficos solubles. Estos pueden ser reactivos ImmTAC. Los reactivos ImmTAC comprenden un TCR soluble, fusionado mediante un conector con un fragmento de anticuerpo específico anti-CD3. Se describen detalles adicionales, incluyendo cómo producir dichos reactivos en el documento WO10/133828.
30

Las características preferentes u opcionales de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos con los cambios debidos. En consecuencia, aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, debería entenderse que pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y alteraciones en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.
35

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes Ejemplos que se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

45 Preparación de ADNc para la construcción de bibliotecas de presentación en fagos de TCR nativo TRAV12.2/TRBV6* y TRAV21/TRBV6*

Aislamiento de ARNm de linfocitos de sangre periférica (PBL)

50 Se extrajo ARN de un grupo de aproximadamente 30 millones de PBL obtenidos de tres donantes de tipo de HLA conocido. La extracción de ARN se llevó a cabo usando reactivo TRI (Sigma, Cat. N.º T9424), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se aisló ARNm posteriormente usando kits de aislamiento de ARNm µMACS™ (Miltenyi, Cat. N.º 130-075-101), como indica el fabricante.

Preparación de ADNc a partir de ARNm

55 Se sintetizó ADNc a partir del ARNm usando transcriptasa inversa SMARTScribe™ (Clontech, 639536), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El ADNc se purificó adicionalmente usando el kit de purificación en gel S.N.A.P. (Invitrogen, 45-0078).

Ejemplo 2

Construcción de bibliotecas de fagos

5 Se muestra un perfil de la construcción de bibliotecas en la Figura 1 y las secuencias de cebadores correspondientes detalladas en la Figura 2. Las cadenas de TCR se amplificaron mediante PCR a partir de ADNc purificado usando cebadores directos de TRAV12.2, TRAV21 o TRBV6* y cebadores inversos que hibridan con las regiones TRAC (cebador YOL237) o las regiones TRBC (cebador YOL 240). Los conjuntos de cebadores se diseñaron en referencia a las secuencias conocidas de cadenas de TCR (T Cell Receptor Facts Book, Lefranc y Lefranc, Publ. Academic Press 2001). Los productos de PCR resultantes comprendían la secuencia del dominio variable completo y un dominio constante truncado (marcados A y B en la Figura 1). La sección C-terminal restante de los dominios de TRAC y TRBC2, que contiene los restos de cisteína no nativos, se amplificaron mediante PCR a partir de un vector de clonación separado usando los cebadores YOL236 y YOL238 para TRAC y YOL239 y YOL22 para TRBC2 (marcados C y D en la Figura 1). Después se unieron fragmentos A/C y B/D purificados en reacciones separadas mediante sus regiones de cebadores solapantes (YOL237/YOL236 y YOL240/YOL239 respectivamente). Los fragmentos A-C y B-D resultantes se purificaron en gel y se unieron mediante PCR solapante usando cebador directo TRAV12.2/ 21 y cebador inverso YOL22, proporcionando las regiones de cebadores TRBV6* y YOL238 la secuencia solapante. Esta reacción de unión final da como resultado recombinación aleatoria entre cadenas alfa y cadenas beta. Los sitios de restricción Nco1/Not1 se usaron para insertar las cadenas recombinadas de forma aleatoria en un vector fagémido adecuado, denominado pIM672 (pIM672 se basa en el vector pEX922 descrito previamente (véase documento WO2005116074)), que después se usó para transformar células de *E. coli* TG1 electrocompetentes muy eficaces para transformación. Los cultivos se sembraron en placas de agar 2xTYag (EzMix, Sigma, Cat. N.º Y2627 más ampicilina 100 µg/ml y glucosa 2 %) durante una noche a 30 °C y los céspedes celulares resultantes se rasparon en un volumen pequeño de medio 2xTYag que contenía glicerol al 20 % y glucosa al 2 %. Se almacenaron reservas de glicerol de las bibliotecas a -80 °C.

Ejemplo 3

Propagación y selección de bibliotecas

30 *Propagación de partículas de fagos*

Se usó una alícuota de reserva de glicerol de bibliotecas de fagos, suficiente para abarcar la diversidad de la biblioteca, (TRAV12.2/TRBV6 y TRAV21/TRBV6) para inocular medios 2xYTag, hasta una DO600 inicial de 0,05. Los cultivos se incubaron después hasta una DO600 de aproximadamente 0,5. Después se añadieron fagos auxiliares a una relación de infección de ~ 20:1 de fagos con respecto a *E. coli*. Los cultivos se mezclaron después invirtiendo e incubando durante 30 min a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en 2xYTak (como 2xYTag pero en ausencia de glucosa y con la adición de kanamicina 50 µg/ml) y posteriormente se incubaron a 26 °C durante 16 h con agitación.

40 *Aislamiento de partículas de fagos*

Los cultivos se agruparon, se centrifugaron y el sobrenadante se recogió y se filtró a 0,45 µm. El eluato se mezcló con 7 ml de PEG/NaCl (PEG-8000 20 % (Sigma Cat. N.º 5413), NaCl 2,5 M) y se incubó en hielo durante 30 min. Después se sedimentó la muestra y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 ml en PBS (Dulbeccos Sigma Cat. N.º D8537 - sin Mg, sin Ca) y se volvió a centrifugar. Se recogió el sobrenadante resultante, se mezcló con 5 ml de PEG/NaCl y se almacenaron en hielo durante 30 min. Después de centrifugar, el sedimento se resuspendió en 3 ml de PBS, se volvió a centrifugar y se recogió el sobrenadante. Se determinó una estimación de la concentración de fagos utilizando un espectrofotómetro Nanodrop, donde el número de fagos por ml = DO260 x (22,14 x 10¹⁰). Se calculó que una biblioteca preparada según este método contenía 6,8 x 10¹² partículas de fagos/ml.

Selección

Se mezclaron partículas de fagos purificadas con tampón de MPBS al 3 % (PBS (Dulbeccos Sigma Cat. N.º D8537 - sin Mg, sin Ca) más leche en polvo al 3 %, previamente incubado con perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, y después tratado con EDTA 15 mM seguido de diálisis extensa y finalmente filtrado a 0,22 µm) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Para la selección 2 y la selección 3 después de los primeros 30 minutos, se añadió una construcción de péptido no biotinilado-HLA irrelevante para selección negativa a una concentración final de 2 µM y la incubación continuó durante 30 min adicionales. Después se añadió Tween-20 al 10 % (v/v) más péptido biotinilado-HLA 100 nM o 1 µM. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 60 min. Se rescataron los complejos de fago-biotinilado-HLA mediante la adición de paramagnéticas recubiertas con estreptavidina prebloqueadas en tampón de MPBS al 3 % y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 min. Después de la captura, las perlas se aislaron usando un concentrador magnético (Dynal) y se lavaron tres veces con MPBS al 3 % (no tratado con EDTA) y dos veces con PBS-Tween al 0,1 %. Las partículas de fagos se eluyeron en 0,5 ml de TBSC (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, CaCl₂ 1 mM y tripsina 0,1 mg/ml) durante 25 min a temperatura ambiente y 5 min a 37 °C con rotación suave.

5 Se usaron partículas de fagos eluidas para infectar células de *E. coli* TG1 de fase logarítmica temprana. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 30 min y posteriormente se sembraron en YTEag (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 8 g de NaCl, 15 g de Bacto-Agar en 1 l de agua-MQ, más ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2 %) en diluciones en serie de 1 µl, 0,1 µl y 0,01 µl. El cultivo restante se concentró y también se sembró en YTEag. Las placas se incubaron a 30 °C durante 16 h. Al día siguiente, se añadieron colonias de las placas a 2xTYag, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C para el siguiente ciclo de selección. Se analizaron colonias de cada selección mediante PCR para comprobar la presencia de insertos de longitud completa.

10 Después del tercer ciclo de selección, las colonias se rasparon de las placas de agar y se usaron para inocular 2xTYag estéril en una placa de cultivo celular Cellstar de 96 pocillos a un clon por pocillo. Las placas se incubaron a 26 °C durante 16 h con agitación. Estos cultivos se usaron después para inocular medios 2xTYag nuevos en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 30 min a 37 °C con agitación hasta DO600 = 0,5. Después se añadieron fagos auxiliares a cada pocillo a una relación de infección de fago - *E. coli* de 20:1 y las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C sin agitación. Se recogieron sedimentos por centrifugación y se resuspendieron en 2xYTak. Las placas se incubaron durante 16 h a 26 °C con agitación. Después las células se sedimentaron y se recogió el sobrenadante para exploración por ELISA.

20 Ejemplo 4

Detección de fago que porta TCR de unión a antígeno mediante exploración por ELISA

Método

25 Se identificaron clones de fagos unidos con el complejo de péptido-HLA mediante exploración por ELISA. Se prepararon placas de ELISA usando péptido biotinilado-HLA de interés y un péptido-HLA de control. Se añadieron partículas de fagos por duplicado a la placa de ELISA de modo que se añadió una muestra a un pocillo que contenía el péptido-HLA de interés y el otro se añadió a un pocillo de control adyacente. Se llevó a cabo detección usando un anticuerpo anti-Fd (Sigma, Cat. N.º B7786) seguido de un conjugado de IgG monoclonal anti-conejo con peroxidasa (clon específico de cadena gamma RG96) (Sigma, Cat. N.º A1949). Se detectó anticuerpo unido usando el sistema de sustrato de peroxidasa de micropocillos TMB de KPL labs (Cat. N.º 50-76-00). La aparición de un color azul en los pocillos indicó que el clon de fago se había unido al antígeno de HLA. Una falta de color en los pocillos de control correspondientes indicó que la unión era específica.

35 *Resultados*

Se preparó una biblioteca de TRAV12.2/21 TRBV6*, usando los métodos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3, excepto que los dos cultivos de bibliotecas [TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6*] se agruparon antes de las etapas de aislamiento de partículas de fagos y selección descritas en el Ejemplo 3. De los tres donantes usados para preparar la biblioteca uno era positivo para HLA-A2, negativo para HLA-A24, uno era positivo para HLA-A24, negativo para HLA-A2 y el tercero era negativo tanto para HLA-A2 como para HLA-A24). Se llevó a cabo exploración por ELISA como se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron resultados de ELISA positivos para 12 péptidos de HLA-A2 diferentes y 1 péptido de HLA-A24, durante 2 campañas de selección que comprenden un total de 16 complejos diferentes de péptidos HLA. Estos datos demuestran que la biblioteca de la invención puede usarse para aislar TCR de unión a antígeno.

Se preparó una segunda biblioteca de TRAV12.2/21 TRBV6* utilizando el mismo método que se ha descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3, excepto que los dos cultivos de bibliotecas [TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6*] se agruparon antes de las etapas de aislamiento de partículas de fagos y selección descritas en el Ejemplo 3 y, además, los tres donantes utilizados para preparar la biblioteca fueron positivos para HLA-A2 HLA-A24. Se llevó a cabo exploración por ELISA utilizando el método descrito anteriormente. Se obtuvieron resultados de ELISA positivos para 16 péptidos de HLA-A2 diferentes y 1 péptido de HLA-A24, durante una campaña de selección que incluyó 18 complejos diferentes de péptidos HLA. Estos datos demuestran que la biblioteca de la invención puede usarse para aislar TCR de unión a antígeno.

55 La Figura 3 muestra los resultados de exploración de ELISA después de selección con cuatro péptidos de HLA-A2 diferentes.

60 Ejemplo 5

Exploración por ELISA de selección de una biblioteca de TRAV12.2/21 TRBV6* preparada a partir de un donante negativo de HLA-A2/HLA-A24

65 Para confirmar que los TCR de unión a antígeno podrían aislarse de una biblioteca preparada a partir de un donante negativo de HLA-A2/HLA-A24, se creó una tercera biblioteca de TRAV12.2/21/TRBV6* utilizando el mismo método descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3, excepto que los dos cultivos de bibliotecas [TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6*]

se agruparon antes de las etapas de aislamiento de partículas de fagos y selección descritas en el Ejemplo 3 y además se produjo ADNc a partir de un único donante negativo para HLA-A2 y HLA-A24. Se llevó a cabo exploración por ELISA utilizando el método del Ejemplo 4. De una sola campaña de selección (que incluyó tres ciclos de selección) que incluía ocho antígenos, se obtuvieron resultados de ELISA para cuatro péptidos de HLA-A2 diferentes y cuatro péptidos de HLA-A24 diferentes. La Figura 4 muestra los resultados de exploración por ELISA después de la selección con tres antígenos diferentes.

Ejemplo 6

Exploración por ELISA de selección de bibliotecas de TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6* individuales

Se prepararon bibliotecas de TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6* individuales utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3. Las bibliotecas no se agruparon antes del aislamiento de fagos y se seleccionaron individualmente. Se obtuvieron resultados de ELISA positivos de bibliotecas tanto de TRAV12.2 TRBV6* como de TRAV21 TRBV6*. La Figura 5 muestra los resultados de exploración de ELISA después de selección con dos antígenos diferentes.

Ejemplo 7

Exploración por ELISA a partir de la selección de TRAV12.2 TRBV6* y TRAV21 TRBV6* individuales creados a partir de una fuente comercial de ARNm

Se creó una biblioteca combinada de TRAV12-2/21/TRBV6* utilizando el mismo método que se ha descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3, excepto que se preparó ADNc a partir de un grupo de ARNm obtenido de una fuente comercial (Clontech Cat. N.º 636170; Lote n.º: 1304103A. Los donantes fueron 380 hombres (edades de 18-40 años) y 170 mujeres (edades de 18-40 años). Todos los donantes fueron examinados para VIH-I, II, Hepatitis B y sífilis). Se usaron 50 µg de ARNm para producir ADNc. Las bibliotecas no se agruparon antes del aislamiento de fagos y se seleccionaron individualmente. Se llevó a cabo exploración por ELISA utilizando el método del Ejemplo 4. Se obtuvieron resultados de ELISA positivos de bibliotecas tanto de TRAV12.2 TRBV6* como de TRAV21 TRBV6*. La Figura 6 muestra los resultados de exploración por ELISA después de selección con un antígeno.

Ejemplo 8

Análisis de secuencias de TCR

La secuencia de ADN de los TCR de clones de fagos positivos para ELISA se puede obtener mediante secuenciación usando métodos conocidos por los expertos en la materia. En algunos casos, los TCR convergen en una única secuencia, en otros casos se identifica más de una secuencia de TCR. Por ejemplo, a partir de las placas de ELISA mostradas en la Figura 3, se obtuvieron tres secuencias de TCR diferentes para el Antígeno 1 y se obtuvieron cuatro secuencias de TCR diferentes para el Antígeno 2. Estos resultados demuestran que pueden aislarse múltiples TCR específicos para antígenos restringidos por HLA de la biblioteca de la invención en una única campaña de selección.

Ejemplo 9

Especificidad de TCR de bibliotecas

Los TCR pueden ensayarse adicionalmente para determinar su especificidad para el complejo de péptido-HLA para el que se seleccionaron durante la selección. Esto se puede lograr usando el mismo enfoque de ELISA que se ha descrito anteriormente y un panel de diferentes complejos de péptido-HLA. La Figura 7 muestra los resultados de otros ensayos de especificidad con TCR, aislados de la exploración de ELISA, que se seleccionaron para unión al Antígeno 1, Antígeno 3 o Antígeno 5. Esto demuestra que los TCR con alta especificidad para el antígeno pueden aislarse de la biblioteca.

Ejemplo 10

Análisis Biacore de TCR obtenidos de la biblioteca

Método

La afinidad por el antígeno de los TCR aislados de la biblioteca se determinó mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento Biacore 3000 y se señaló en términos de una constante de disociación en equilibrio (KD). Las secuencias de TCR obtenidas de los clones de fagos se usaron para producir versiones solubles de los TCR utilizando el método descrito en Boulter, *et al.*, Protein Eng, 2003. 16: 707-711. Se prepararon monómeros de pMHC biotinilados específicos y de control como se describe en Garboczi, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 1992. 89: 3429-3433 y O'Callaghan, *et al.*, Anal Biochem 1999. 266: 9-15, y se inmovilizaron en un chip sensor CM-5 acoplado a estreptavidina. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C en tampón de PBS (Sigma) complementado

con Tween al 0,005 % (Sigma) a un caudal constante. Para medir la afinidad, se hicieron fluir diluciones en serie de los TCR solubles sobre los pMHC inmovilizados y se determinaron los valores de respuesta en equilibrio para cada concentración. Las constantes de disociación en equilibrio (KD) se determinaron representando la unión en equilibrio específica frente a la concentración de proteína seguida de un ajuste de mínimos cuadráticos a la ecuación de unión de Langmuir, suponiendo una interacción 1:1.

Resultados

La Figura 8 muestra las curvas de unión y la constante de disociación en equilibrio (KD) para los cuatro TCR obtenidos para el Antígeno 2 y dos de los TCR obtenidos para el Antígeno 3. Esto demuestra que los TCR aislados de la biblioteca tienen una afinidad útil por el antígeno correspondiente.

Ejemplo 11

Los TCR obtenidos de la biblioteca se pueden mejorar por afinidad

Un TCR de péptido-HLA específico aislado de una biblioteca de TRAV 12.2/21 TRBV6* tenía una afinidad (KD) de 25 μM como se determinó mediante el método de resonancia de plasmón superficial descrito en el Ejemplo 10. Para obtener variantes de mayor afinidad de este TCR, se mutó la secuencia de dominio variable de las cadenas alfa y beta. Los expertos en la materia conocen métodos para producir variantes de TCR de alta afinidad mutadas, tales como presentación en fagos y mutagénesis dirigida (por ejemplo, véase el documento WO04044004 y Li *et al.*, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354). La afinidad y la semivida de las variantes de TCR para el antígeno se analizaron mediante cinética de ciclo único utilizando BIAcore3000. Los pHLA específicos y de control se inmovilizaron en diferentes celdas de flujo y se inyectaron concentraciones crecientes de TCR. Se realizó ajuste global utilizando el software BIAevaluation para obtener simultáneamente K_{on} , K_{off} , K_D y valores de semivida.

Resultados

Se aislaron varias variantes con mutaciones en la cadena alfa (A) o beta (B) y que tenían mayor afinidad por el antígeno

<u>Variante de TCR</u>	<u>KD (nM)</u>	<u>Semivida</u>
<u>A1</u>	<u>14</u>	<u>6,8 min</u>
<u>A2</u>	<u>33</u>	<u>6 min</u>
<u>A3</u>	<u>80</u>	<u>47 s</u>
<u>A5</u>	<u>33</u>	<u>34,5 min</u>
<u>A8</u>	<u>340</u>	<u>2 s</u>
<u>A9</u>	<u>81</u>	<u>36 s</u>
<u>A10</u>	<u>7</u>	<u>9,4 min</u>
<u>A14</u>	<u>13</u>	<u>2,9 min</u>
<u>B1</u>	<u>85</u>	<u>27 s</u>
<u>B2</u>	<u>87</u>	<u>26 s</u>
<u>B3</u>	<u>22</u>	<u>63 s</u>
<u>B4</u>	<u>73</u>	<u>21 s</u>
<u>B5</u>	<u>18</u>	<u>73 s</u>
<u>B8</u>	<u>220</u>	<u>43 s</u>
<u>B9</u>	<u>860</u>	<u>1,8 s</u>
<u>B10</u>	<u>1100</u>	<u>1,6 s</u>

Se fusionaron varias variantes de cadena beta con un anticuerpo anti-CD3 y se replegaron con variantes de cadena alfa seleccionadas para producir proteínas de fusión de TCR solubles, adecuadas para su uso en aplicaciones inmunoterapéuticas. Se encuentran detalles adicionales que describen la producción de dichas proteínas de fusión de TCR en el documento WO10133828. Se realizaron mediciones de afinidad y semivida como se ha descrito anteriormente.

<u>Fusión de TCR</u>	<u>KD (pM)</u>	<u>Semivida (h)</u>
<u>A2B1</u>	<u>24</u>	<u>20</u>
<u>A2B5</u>	<u>20</u>	<u>24</u>
<u>A2B3</u>	<u>39</u>	<u>15</u>
<u>A10B1</u>	<u>18</u>	<u>20</u>
<u>A10B3</u>	<u>25</u>	<u>13</u>
<u>A10B5</u>	<u>19</u>	<u>16</u>

Ejemplo comparativo

Aislamiento de TCR de unión a antígeno de sangre nueva

5 Antes de la construcción de la biblioteca de la invención, se obtuvieron TCR específicos de antígeno a partir de linfocitos T aislados de sangre nueva de donante, después de la estimulación con un péptido-antígeno de HLA de interés. Los experimentos se dividieron en campañas de clonación, que implicaban hasta 20 antígenos diferentes y
 10 sangre nueva obtenida de entre 12 y 20 donantes individuales. Las cadenas de TCR se amplificaron a partir de los linfocitos T que respondieron y se usaron para producir TCR solubles. La unión al antígeno se demostró mediante el método de Biacore del Ejemplo 10.

Método

15 Se obtuvieron linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas de 200 ml de sangre nueva de donante. Se realizaron tres ciclos de estimulaciones, primero con DC autólogas y después con linfocitos B autólogos pulsados con el panel de péptidos antigénicos de interés. Los linfocitos T activados se detectaron mediante un ensayo ELISpot (BD Biosciences) y células T2 pulsadas con los péptidos antigénicos de interés o con un antígeno de control irrelevante. Las células que
 20 respondieron se tiñeron para interferón gamma (IFN γ) y se clasificaron por expresión de IFN γ o CD8. Las líneas celulares de unión a antígeno se confirmaron mediante ensayo ELISpot y tinción con tetrámero. Las cadenas de TCR de clones validados se amplificaron mediante amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) y se clonaron en un vector de expresión de *E. coli*. Los TCR se purificaron y replegaron a partir de cuerpos de inclusión. La unión a antígeno se confirmó mediante la unión en Biacore.

25 *Resultados*

De cinco campañas de clonación llevadas a cabo durante varios años, se identificaron menos de 10 TCR específicos de unión a antígeno. Por lo tanto, la biblioteca de la invención es mucho más eficaz para obtener TCR que el enfoque
 30 utilizado en este ejemplo.

En referencia a los antígenos ejemplificados anteriormente, los antígenos 1 y 2 se incluyeron en dos campañas (4 + 5 y 3 + 4, respectivamente) y los antígenos 3 y 4 se incluyeron en una campaña (4 y 5, respectivamente). No se obtuvieron TCR específicos para los antígenos 1, 2 y 3 utilizando este método. Se obtuvo un único TCR que se unía al Antígeno 4. Esto demuestra que incluso para los mismos antígenos, la biblioteca de la invención es mucho más
 35 eficaz para obtener TCR que el enfoque utilizado en este ejemplo.

Los tres donantes de sangre HLA-A2/HLA-A24, usados para crear la segunda biblioteca del Ejemplo 4, descrito anteriormente, se han utilizado en algunas de las campañas de clonación. Uno se utilizó en las campañas 1, 2, 4 y 5; el segundo se usó en las campañas 4 y 5; y un tercero se usó en la campaña 5. Esto demuestra que incluso utilizando
 40 los mismos donantes, la biblioteca de la invención es mucho más eficaz para obtener TCR que el enfoque utilizado en este ejemplo.

Como se ha demostrado, se han llevado a cabo muchas campañas de clonación para tratar de aislar TCR específicos de unión a antígenos, con muy poco éxito. Las campañas fueron laboriosas, poco fiables e implicaron la recogida de múltiples donaciones de sangre de muchos donantes. Los resultados presentados en este documento muestran que la presente invención permite la identificación rápida, eficaz y fiable de múltiples TCR de unión a antígeno, que no
 45 pudieron identificarse o fueron muy difíciles de identificar con técnicas previamente conocidas.

Habiendo descrito de este modo en detalle realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por los párrafos anteriores no debe limitarse a los detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones evidentes de la misma sin alejarse del alcance de la presente
 50 invención.

REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de receptores de linfocitos T (TCR) diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden una cadena alfa que comprende un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y una cadena beta que comprende un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6.
2. Una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de receptores de linfocitos T (TCR) diferentes, en donde la pluralidad de TCR consiste esencialmente en TCR que comprenden una cadena alfa que comprende un dominio variable de cadena alfa de un repertorio natural y una cadena beta que comprende un dominio variable de cadena beta de un repertorio natural, en donde el dominio variable de cadena alfa comprende un producto génico de TRAV12-2 o TRAV21 y el dominio variable de cadena beta comprende un producto génico de TRBV6 y en donde al menos una parte de los TCR comprende un dominio variable de cadena alfa y/o un dominio variable de cadena beta que comprende una mutación no natural.
3. La biblioteca según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el producto génico de TRBV6 es un producto génico de TRBV6-1, TRBV6-2, TRBV6-3, TRBV6-5 o TRBV6-6.
4. La biblioteca según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio variable de cadena alfa y el dominio variable de cadena beta se presentan como una única cadena polipeptídica.
5. La biblioteca según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los TCR comprenden un enlace disulfuro no nativo o un enlace disulfuro nativo entre una región constante de la cadena alfa y una región constante de la cadena beta.
6. La biblioteca según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las partículas son partículas de fago, ribosomas, células de levadura o células de mamífero.
7. Un receptor de linfocitos T (TCR) aislado no natural que comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende un producto génico de TRAV12-2 o un producto génico de TRAV21 y un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende un producto génico de TRBV6 obtenido de una biblioteca según la reivindicación 2.
8. Uso de una biblioteca según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para identificar un TCR que se une específicamente a un antígeno peptídico.
9. Un método para obtener un receptor de linfocitos T que se une específicamente a un antígeno peptídico, que comprende explorar la biblioteca según la reivindicación 1 o reivindicación 2 con el antígeno peptídico, comprendiendo el método:
 - a) seleccionar de la biblioteca utilizando como diana el antígeno peptídico;
 - b) repetir la etapa a) una o más veces;
 - c) explorar los clones de fagos identificados en la etapa a) o b); y
 - d) identificar un TCR que se une específicamente al antígeno peptídico.
10. Un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena alfa de TCR y un dominio variable de cadena beta del TCR según la reivindicación 7.
11. Un método para realizar una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, comprendiendo el método:
 - i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa TRAV12-2 o TRAV21;
 - ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6;
 - iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión;
 - iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y
 - v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos.
12. Un método para realizar una biblioteca de partículas, presentando la biblioteca una pluralidad de TCR diferentes, comprendiendo el método:

- i) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 utilizando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21;
- 5 ii) obtener una pluralidad de ácidos nucleicos de un repertorio natural que codifica diferentes dominios variables de cadena beta de TRBV6 usando cebadores que hibridan con ácidos nucleicos que codifican dominios variables de cadena beta de TRBV6;
- iii) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena alfa de TRAV12-2 o TRAV21 en vectores de expresión;
- 10 iv) clonar los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de cadena beta de TRBV6 en los mismos o diferentes vectores; y
- v) expresar los vectores en partículas, generando de este modo una biblioteca que consiste esencialmente en TCR que comprenden un dominio variable de cadena alfa y un dominio variable de cadena beta codificado por los ácidos nucleicos con los que dichos cebadores hibridan.
- 15 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende una etapa adicional de introducción de mutaciones no naturales a los ácidos nucleicos, opcionalmente en donde se introducen mutaciones no naturales en los ácidos nucleicos antes de la etapa iii).
- 20 14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el dominio variable de cadena alfa de TCR y el dominio variable de cadena beta de TCR se expresan como un polipéptido de cadena sencilla.
15. Un método para obtener un receptor de linfocitos T que se une específicamente a un antígeno peptídico, que comprende explorar la biblioteca según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 con el antígeno peptídico.
- 25 16. Una partícula que presenta en su superficie un TCR según la reivindicación 7, opcionalmente en donde la partícula es una partícula de fago, un ribosoma, una célula de levadura o una célula de mamífero.

Figura 1

Esquema de la etapa de clonación utilizada en la construcción de bibliotecas

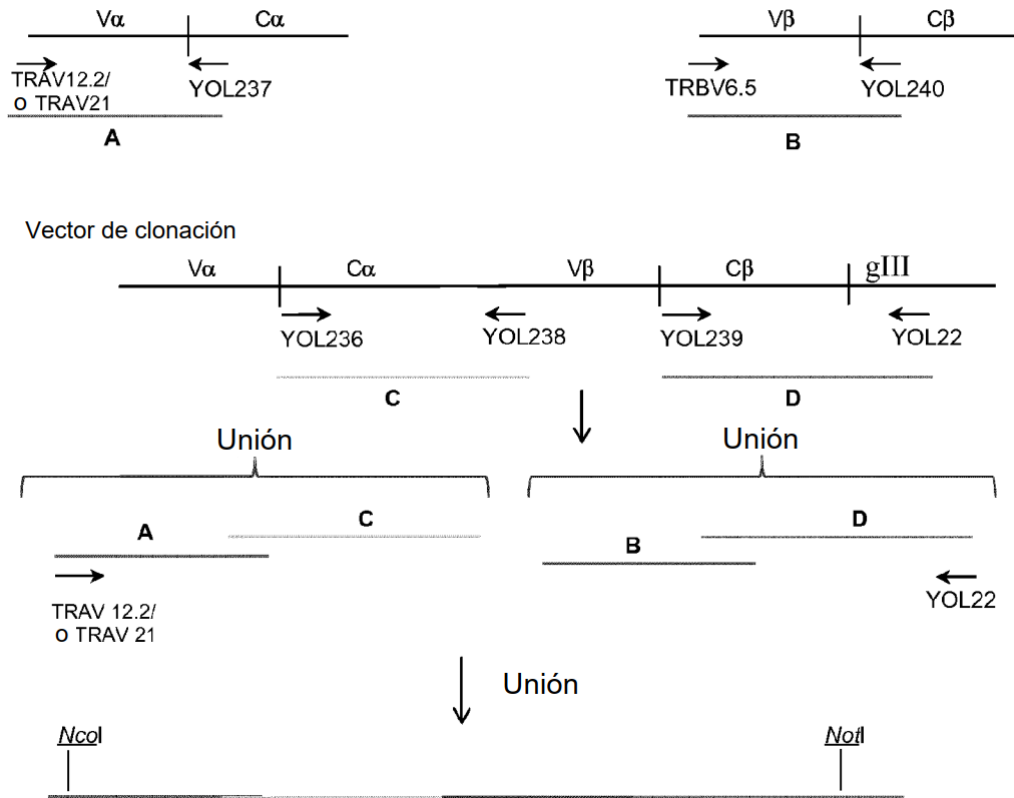


Figura 2

Secuencias de cebadores usadas en la construcción de bibliotecas

YOL22	cattttcagggatagcaagc	SEQ ID No: 1
TRBV6-5	ttctattctcacagcgcgaatgctgggtgcactcagaccccaaaattc	SEQ ID No: 2
TRAV12- 2	gcccagccggccatggcccagaaggaggtggagcagaattc	SEQ ID No: 3
TRAV21	gcccagccggccatggcacaacaggaggtgacgcagattcc	SEQ ID No: 4
YOL237	gagtctctcagctggtacacgg	SEQ ID No: 5
YOL240	agtgtggccttttgggtgtg	SEQ ID No: 6
YOL236	ccgtgtaccagctgagagactc	SEQ ID No: 7
YOL238	gcgcgctgtgagaatagaaag	SEQ ID No: 8
YOL239	cacacccaaaaggccacact	SEQ ID No: 9

Figura 3

Exploración por ELISA de una biblioteca de TRAV 12.2/21 TRBV 6* agrupada seleccionada con 4 antígenos peptídicos de HLA diferentes. CMV indica antígeno de control negativo

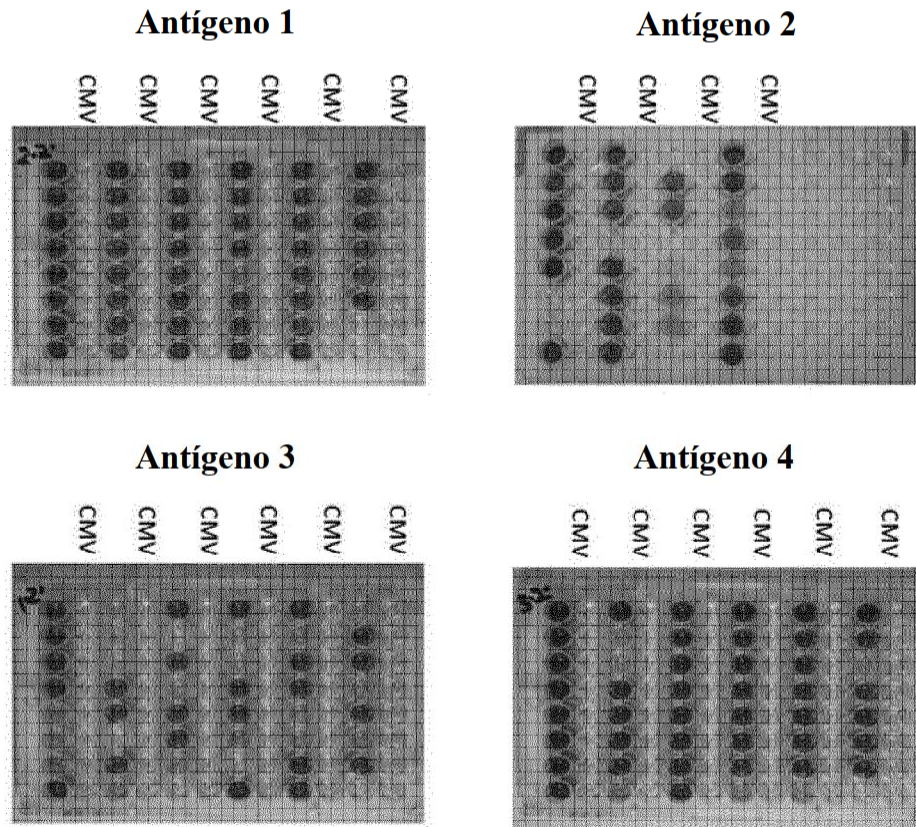


Figura 4

Exploración por ELISA de una biblioteca de TRAV 12.2/21 TRBV 6* agrupada preparada a partir de un único donante HLA-A2/A24 negativo y seleccionada con 3 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo

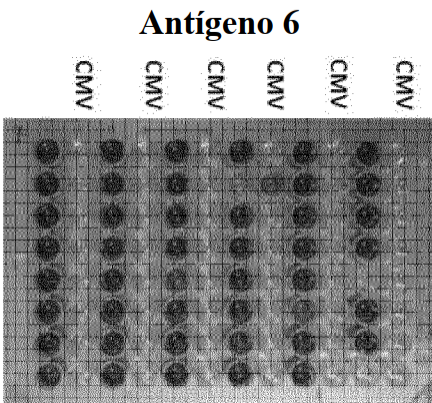
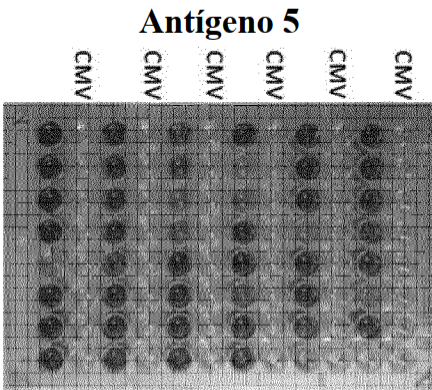
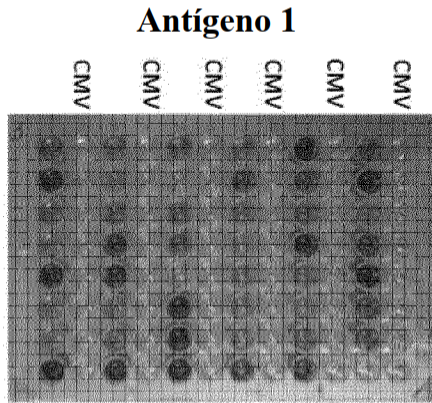
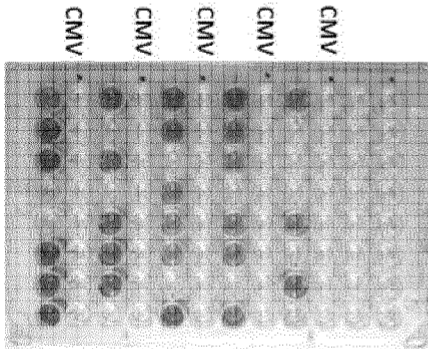


Figura 5

Exploración por ELISA de bibliotecas de TRAV 12.2 TRBV 6* / TRAV21 TRBV 6* individuales seleccionadas con 2 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo

Antígeno 7



Antígeno 8

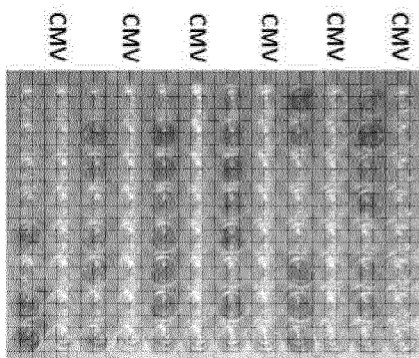
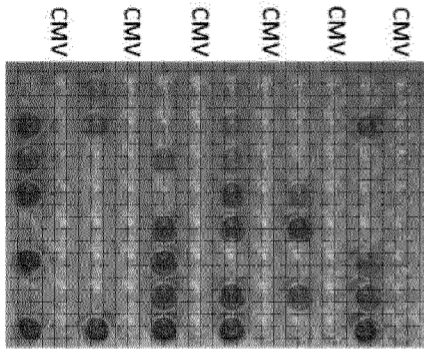


Figura 6

Exploración por ELISA de bibliotecas de TRAV 12.2 TRBV 6* / TRAV21 TRBV 6* individuales preparadas a partir de una fuente de ARNm comercial y seleccionadas con 2 antígenos peptídicos de HLA. CMV indica antígeno de control negativo

Antígeno 8



Antígeno 9

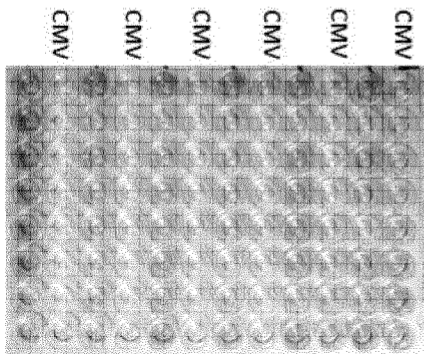
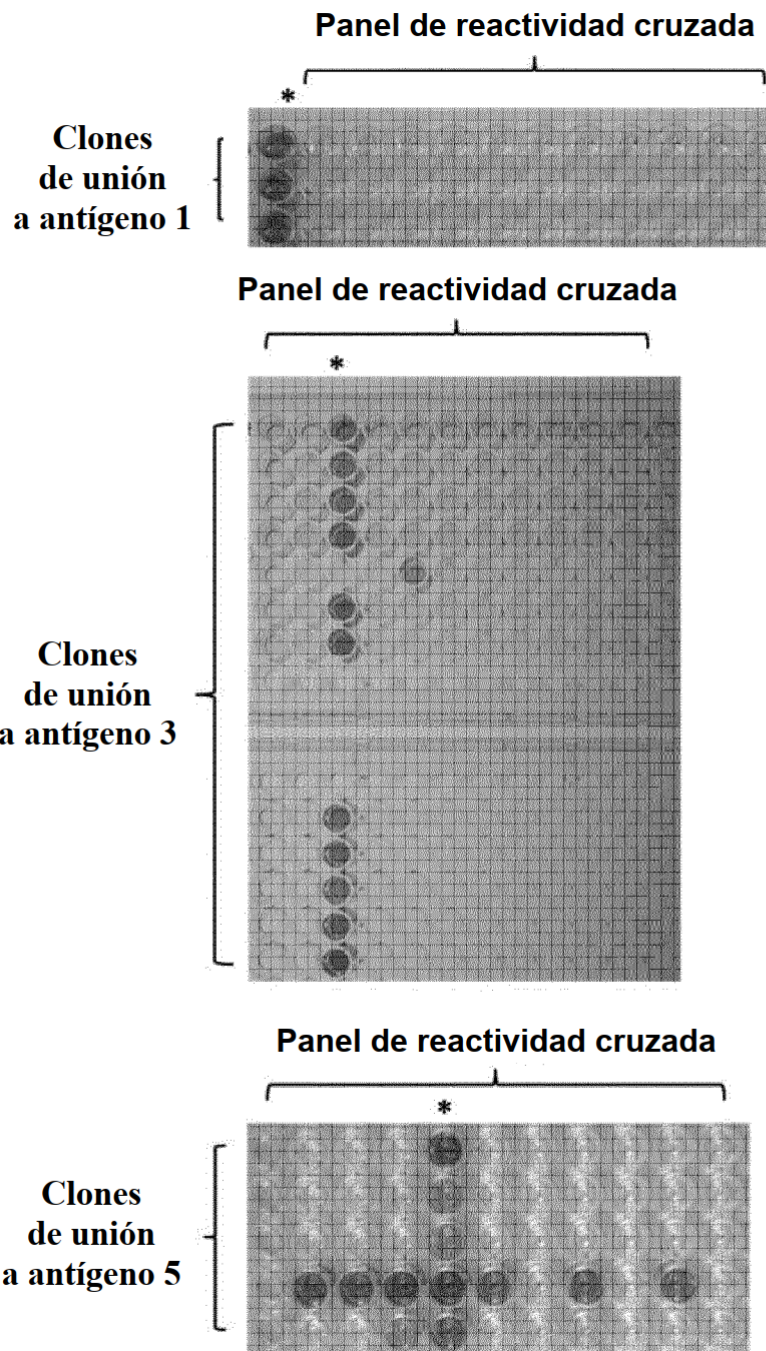


Figura 7

Ensayo de especificidad de TCR aislados de una biblioteca de la invención

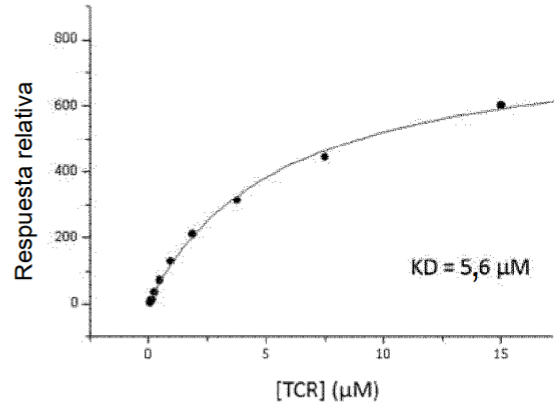
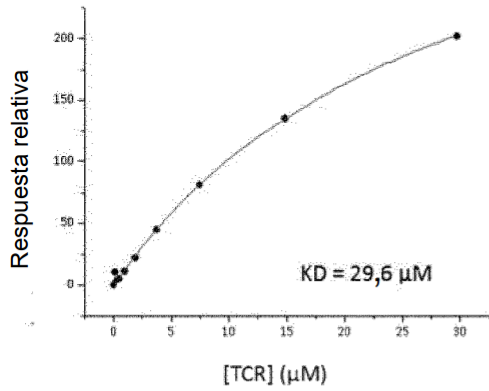
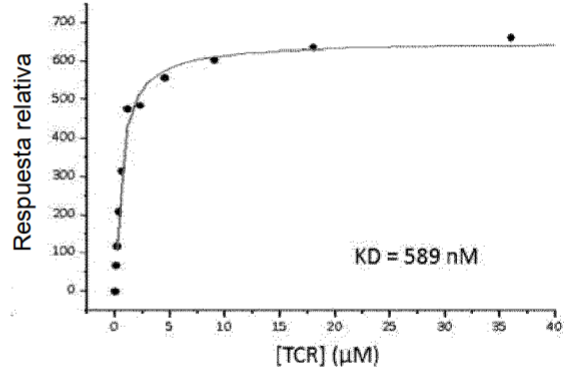
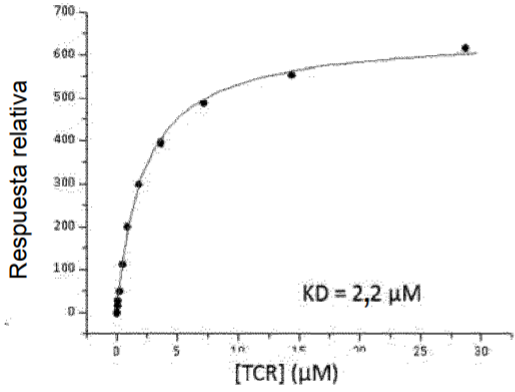


* Control positivo

Figura 8

Curvas de unión de Biacore para versiones solubles de TRC específicos de antígeno aislados de una biblioteca de la invención

TRC de antígeno 2



TRC de antígeno 3

