

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 188**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2017 PCT/EP2017/058578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2017 E 17716871 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3440104**

54 Título: **Receptores de linfocitos T**

30 Prioridad:  
**08.04.2016 GB 201606156**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.10.2020**

73 Titular/es:  
**ADAPT IMMUNE LIMITED (100.0%)  
60 Jubilee Avenue, Milton Park  
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RX, GB**

72 Inventor/es:  
**TRIBBLE, NICHOLAS;  
LAWRANCE, WILLIAM y  
BAGG, ELEANOR**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 788 188 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T

### Lista de secuencias

5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (TCR) que se unen al decapeptido restringido para HLA-A\*0201 GVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) derivado de la proteína B2 del antígeno asociado a melanoma (MAGE) (aminoácidos 230 - 239) y el decapeptido restringido para HLA-A\*0201 GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) derivado de la proteína A4 del antígeno asociado a melanoma (MAGE). Los TCR de la invención demuestran excelentes perfiles de especificidad para estos epítomos de MAGE.

### Antecedentes de la invención

10 Los antígenos de cáncer testicular (CTA) son una subclase de antígeno asociado a tumor (TAA) codificado por aproximadamente 140 genes. La expresión de estos antígenos está restringida en sitios inmunológicamente privilegiados tales como los testículos, la placenta y el ovario fetal; típicamente no se expresan en otros tejidos. Se ha observado la expresión de estos genes en tumores malignos. La inmunogenicidad de los CTA ha conducido al amplio desarrollo de vacunas contra el cáncer que se dirigen a estos antígenos en muchos tumores sólidos. Dentro de esta  
15 gran clase de TAA, los antígenos asociados a melanoma (MAGE) han surgido como candidatos prometedores para la inmunoterapia del cáncer.

Se han descrito más de 30 genes del cáncer testicular (CT) como miembros de familias de múltiples genes que están organizados en grupos de genes en el cromosoma X (antígenos CT-X). Los grupos de genes del CT se encuentran entre Xq24 y Xq28 e incluyen familias de genes tales como MAGE y NY-ESO-1. Los grupos de genes MAGE tipo I  
20 son los más ampliamente caracterizados e incluyen las familias MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C. Las proteínas MAGE-A son codificadas por 12 miembros diferentes de la familia de genes MAGE-A (MAGE-A1 a MAGE-A12) y están definidas por una base de 165-171 aminoácidos conservados, llamada dominio de homología MAGE (MHD). El MHD corresponde a la única región de aminoácidos compartidos por todos los miembros de la familia MAGE-A.

Los linfocitos T reconocen e interaccionan con complejos de moléculas de la superficie celular, denominados antígenos leucocitarios humanos ("HLA"), o complejos mayores de histocompatibilidad ("MHC") y péptidos. Los péptidos derivan de moléculas más grandes, que son procesadas por las células que también presentan la molécula HLA/MHC. La interacción de los linfocitos T y los complejos de HLA/péptido está restringida, requiriendo un linfocito T específico para una combinación particular de una molécula HLA y un péptido. Si no está presente un linfocito T específico, no hay respuesta de linfocitos T incluso si está presente su complejo asociado. Del mismo modo, no hay respuesta si el  
30 complejo específico está ausente, pero el linfocito T está presente. El mecanismo está implicado en la respuesta del sistema inmunitario a la infección, en la enfermedad autoinmunitaria y en las respuestas a anomalías tales como tumores.

Algunas proteínas de la familia de genes MAGE solo son expresadas en células germinales y de cáncer (familias de MAGE-A a MAGE-C). Otras son expresadas ampliamente en tejidos normales (de MAGE-D a MAGE-H). Todas estas familias de proteínas MAGE tienen una región homóloga que se corresponde estrechamente con la secuencia de las otras proteínas MAGE y comprende péptidos presentados como complejos de HLA/péptido en el reconocimiento inmunitario. Por lo tanto, es importante seleccionar candidatos clínicos de TCR que sean altamente específicos para el antígeno péptido MAGE/HLA-A2 deseado.  
35

MAGE B2 es un miembro de los CTA de la familia de genes MAGE B. La función es desconocida, aunque se cree que puede tener una función en el desarrollo embrionario. En la patogénesis tumoral, parece que está implicado en la transformación tumoral o en aspectos del avance tumoral. MAGE B2 se ha implicado en una gran cantidad de tumores. El péptido GVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) corresponde a los restos de aminoácidos números 231 -241 de la proteína MAGE-B2 conocida.  
40

MAGE A4 es un CTA de la familia de genes MAGE A. MAGE A4 es expresada en testículos y placenta, y en una fracción significativa de tumores de varios tipos histológicos. El péptido GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) muestra reactividad cruzada con MAGE B2, de modo que ciertos TCR se pueden unir a moléculas de HLA que presentan ambos péptidos.  
45

El documento WO2014/201021 describe células específicas de tumores inmunosensibles que expresan un TCR y en donde el antígeno tumoral puede ser MAGE A4 combinado con MAGE B2 en general.

### 50 Resumen de la invención

Los autores de la invención han desarrollado un TCR que se une a moléculas HLA que presentan el péptido MAGE B2 GVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) así como al péptido MAGE A4 GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1). En un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a GVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) y GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) en complejo con HLA-A\*0201 con una constante de disociación de aproximadamente 0.05  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20.0  $\mu\text{M}$  cuando se mide con resonancia de plasmón  
55

de superficie a 25°C y a un pH entre 7.1 y 7.5 usando una forma soluble del TCR, en donde el TCR comprende un dominio variable de la cadena alfa de TCR y un dominio variable de la cadena beta de TCR, y en donde los dominios variables de TCR forman contactos con al menos los restos V2, Y3 y D4 de GGYDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) y con al menos los restos V2, Y3 y D4 de GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1)

- 5 En realizaciones, el TCR de acuerdo con la invención tiene la propiedad de unirse a GGYDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) y GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) en complejo con HLA-A\*0201 con una constante de disociación de aproximadamente 20  $\mu$ M a aproximadamente 50  $\mu$ M cuando se mide con resonancia de plasmón de superficie a 25°C y a un pH entre 7.1 y 7.5 usando una forma soluble del TCR, en donde el TCR comprende un dominio variable de la cadena alfa de TCR y un dominio variable de la cadena beta de TCR. En algunas realizaciones, la constante de disociación está por encima de 50  $\mu$ M, tal como 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M o más.

En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena alfa del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1 -105 de la SEQ ID NO: 3 (cadena alfa), y/o el dominio variable de la cadena beta comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1 -123 de la SEQ ID NO: 4 (cadena beta).

- 15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a GGYDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) y GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) en complejo con HLA-A\*0201 y que comprende un dominio variable de la cadena alfa de TCR y un dominio variable de la cadena beta de TCR,

comprendiendo el dominio variable de la cadena alfa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1 -105 de la SEC ID NO: 3, y/o

- 20 comprendiendo el dominio variable de cadena beta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1 -123 de la SEC ID NO: 4.

Los complejos de GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A2 y GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A2 proporcionan marcadores de cáncer a los que se pueden dirigir los TCR de la invención. La presente invención proporciona dichos TCR útiles para el propósito de suministrar agentes efectores citotóxicos o inmunitarios a las células de cáncer y/o útiles para su uso en terapia adoptiva.

- 25 Los TCR se describen usando la nomenclatura de TCR de inmunogenética internacional (IMGT) y enlaces a la base de datos pública IMGT de secuencias de TCR. Los TCR heterodímeros alfa-beta naturales 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 contiene normalmente una región de diversidad corta entre las regiones variables y de unión, pero esta región de diversidad a menudo se considera parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de la complementariedad) insertadas en una secuencia de región armazón, una de las cuales es la región hipervariable denominada CDR3. Hay varios tipos de regiones variables de cadena alfa ( $V\alpha$ ) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ( $V\beta$ ) que se distinguen por sus secuencias de la región armazón, CDR1 y CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida. Los tipos  $V\alpha$  se denominan en la nomenclatura de IMGT mediante un número TRAV único. Por lo tanto, "TRAV21" define una región  $V\alpha$  de TCR que tiene secuencias únicas de región armazón y CDR1 y CDR2, y una secuencia de CDR3 que está parcialmente definida por una secuencia de aminoácidos que se conserva de TCR a TCR pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de TCR a TCR. Del mismo modo, "TRBV5-1" define una región de  $V\beta$  de TCR que tiene secuencias únicas de región armazón y CDR1 y CDR2, pero con solo una secuencia de CDR3 parcialmente definida.

- 40 Las regiones de unión del TCR se definen de manera similar por la nomenclatura única de IMGT TRAJ y TRBJ, y las regiones constantes por la nomenclatura de IMGT TRAC y TRBC.

La región de diversidad de la cadena beta en la nomenclatura de IMGT se denomina mediante la abreviatura TRBD, y, como se ha mencionado, las regiones concatenadas TRBD/TRBJ a menudo se consideran juntas como la región de unión.

- 45 Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los TCR  $\alpha\beta$  en general se considera que tienen cada una dos "dominios", en concreto dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de región variable y región de unión. En la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la expresión "dominio variable alfa de TCR" se refiere por lo tanto a la concatenación de regiones TRAV y TRAJ, y la expresión dominio constante alfa de TCR se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia de TRAC truncada C-terminal. Del mismo modo, la expresión "dominio variable beta de TCR" se refiere a la concatenación de regiones TRBV y TRBD/TRBJ, y la expresión dominio constante beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia de TRBC truncada C-terminal.

- 55 Las secuencias únicas definidas por la nomenclatura de IMGT son ampliamente conocidas y accesibles para los que trabajan en el campo de TCR. Por ejemplo, se pueden encontrar en la base de datos pública IMGT. El "T cell Receptor Factsbook", (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 también describe secuencias definidas por la nomenclatura de IMGT, pero debido a su fecha de publicación y el consiguiente retraso de tiempo, la información contenida en el mismos a veces debe ser confirmada por referencia a la base de datos IMGT.

Un TCR de acuerdo con la invención comprende un dominio extracelular de cadena alfa como se muestra en la SEQ ID NO: 3 (TRAV10 + TRAC) y un dominio extracelular de cadena beta como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (TRBV24-1 + TRBC-2). Las expresiones "TCR parental", "TCR MAGE-A4 parental", se usan como sinónimos en la presente memoria para referirse a este TCR que comprende la cadena alfa y beta extracelular de las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente. Es deseable proporcionar TCR que estén mutados o modificados en relación con el TCR parental que tengan una mayor afinidad y/o una constante de disociación más lenta para el complejo péptido-HLA que el TCR parental.

Con el fin de proporcionar un TCR de referencia con el que se pueda comparar el perfil de unión de dichos TCR mutados o modificados, es conveniente usar un TCR soluble de acuerdo con la invención que tenga la secuencia extracelular de la cadena alfa de TCR MAGE-A4 parental dada en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia extracelular de la cadena beta de TCR MAGE-A4 parental dada en la SEQ ID NO: 4. Ese TCR se denomina en la presente memoria "el TCR de referencia" o "el TCR MAGE-A4 de referencia". Obsérvese que la SEQ ID NO: 5 comprende la secuencia extracelular de la cadena alfa parental de SEQ ID NO: 3 y que T162 (es decir, T48 de TRAC) se ha sustituido por C162. Del mismo modo, la SEQ ID NO: 6 es la secuencia extracelular de cadena beta parental de SEQ ID NO: 4 y que S169 (es decir, S57 de TRBC2) se ha sustituido por C169, C187 se ha sustituido por A187 y N201 se ha sustituido por D201. Estas sustituciones de cisteína con respecto a las secuencias extracelulares de las cadenas alfa y beta parentales permiten la formación de un enlace disulfuro entre cadenas que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado por replegado de las cadenas alfa y beta extracelulares. El uso del TCR soluble unido por disulfuro estable como el TCR de referencia permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y la semivida de unión. Los TCR de la invención pueden comprender las mutaciones descritas antes.

Los TCR de la invención pueden ser de origen no natural y/o purificados y/o genéticamente modificados. Los TCR de la invención pueden tener más de una mutación presente en el dominio variable de la cadena alfa y/o el dominio variable de la cadena beta con respecto al TCR parental. "TCR genéticamente modificado" y "TCR mutante" se usan como sinónimos en la presente memoria y en general significan un TCR que tiene una o más mutaciones introducidas con respecto al TCR parental, en particular en el dominio variable de la cadena alfa y/o el dominio variable de la cadena beta del mismo. Esta o estas mutaciones pueden mejorar la afinidad de unión por GVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) en complejo con HLA-A\*020101. En ciertas realizaciones, hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mutaciones en el dominio variable de la cadena alfa, por ejemplo 4 u 8 mutaciones, y/o 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones en el dominio variable de la cadena beta, por ejemplo 5 mutaciones. En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena  $\alpha$  del TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 1 - 105 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena  $\beta$  del TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 1 -123 de la SEQ ID NO: 4.

El dominio variable de la cadena alfa de un TCR de la invención puede tener la siguiente mutación:

CDR2 M4	V
CDR3S4	T
CDR3 S4	N

en relación con la numeración mostrada en la SEQ ID NO: 3, y/o

el dominio variable de la cadena beta puede tener al menos una de las siguientes mutaciones:

CDR3 N10	G
CDR3 N10	V
CDR2 S1	A
CDR3S4	T
CDR3 N10	E

en relación con la numeración mostrada en la SEQ ID NO: 4.

El dominio variable de la cadena alfa de un TCR de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de los restos de aminoácidos 1-105 de la SEQ ID NO: 3 o 7 u 8 o 9

o una secuencia de aminoácidos en la que sus restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 54-90 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 54-90 respectivamente de la SEQ ID NO: 3 o 7 u 8 y en la que los restos de aminoácidos 28-33, 48-53 y 91-105 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 28-33, 48-53 y 91-105 respectivamente de la SEQ ID NO: 3 o 7 u 8 o 9.

En el dominio variable de la cadena alfa, la secuencia de

- (i) los restos de aminoácidos 1-26 de la misma puede tener (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-26 de la SEQ ID NO: 3, o (b) puede tener uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- (ii) los restos de aminoácidos 28-33 es VSPFSN (SEQ ID NO: 19)
- 5 (iii) los restos de aminoácidos 33-49 de la misma puede tener (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 34-47 de la SEQ ID NO: 3, o (b) puede tener uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- (iv) los restos de aminoácidos 48-53 puede ser LTIMTF o LTRMTF (SEQ ID NO: 21)
- 10 (v) los restos de aminoácidos 55-89 de la misma puede tener al menos 90% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 54-90 de la SEQ ID NO: 3, o puede tener una, dos o tres inserciones, eliminaciones o sustituciones con respecto a la misma;
- (vi) los aminoácidos 91-105 puede ser CVVSGGTDSWGKLQF

El dominio variable de la cadena beta de un TCR de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 6 o de 10 a 12

- 15 o una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos 1-45, 51-67, 74-109 de la misma tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-45, 51-67, 74-109 respectivamente de la SEQ ID NO: 4 o 6 o de 10 a 12 y en la que los restos de aminoácidos 46-50, 68-73 y 109-123 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 46-50, 68-73 y 109-123 respectivamente de la SEQ ID NO: 4 o 6 o de 10 a 12.
- 20 En el dominio variable de la cadena beta, la secuencia de
  - (i) los restos de aminoácidos 1-45 de la misma puede tener (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los restos 1-45 de la SEQ ID NO: 4, o (b) puede tener uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
  - (ii) los restos de aminoácidos 46-50 puede ser KGHDR (SEQ ID NO: 23) o KGRDR (SEQ ID NO: 24)
  - 25 (iii) los restos de aminoácidos 51-67 de la misma puede tener (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 51-67 de la SEQ ID NO: 4, o (b) puede tener uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
  - (iv) los restos de aminoácidos 68-73 puede ser SVFDK (SEQ ID NO: 25);
  - 30 (v) los restos de aminoácidos 54-90 de la misma puede tener (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 54-90 de la SEQ ID NO: 4, o (b) puede tener uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
  - (vi) los aminoácidos 109-123 es CATSGQGAYNEQFF (SEQ ID NO: 26) o CATSGQGAYREQFF (SEQ ID NO: 27) o CATSGQGAYKEQFF (SEQ ID NO: 28)

35 Un TCR de la invención puede tener una de las siguientes combinaciones de dominios variables de cadena alfa y beta:

SEQ ID NO de cadena alfa	SEQ ID NO de cadena beta
3	4
3	6
3	10
3	11
3	12
5	4
5	6
5	10
5	11
5	12
7	4
7	6
7	10
7	11
7	12
8	4

SEQ ID NO de cadena alfa	SEQ ID NO de cadena beta
8	6
8	10
8	11
8	12
9	4
9	6
9	10
9	11
9	12

Están dentro del alcance de la invención las variantes fenotípicamente silenciosas de cualquier TCR de la invención descrito en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, se entiende que la expresión "variantes fenotípicamente silenciosas" se refiere a un TCR que incorpora uno o más cambios de aminoácidos adicionales además de los expuestos antes, cuyo TCR tiene un fenotipo similar al TCR correspondiente sin dicho(s) cambio(s). Para los fines de esta solicitud, el fenotipo del TCR comprende especificidad de unión al antígeno ( $K_D$  y/o semivida de unión) y especificidad de antígeno. Una variante fenotípicamente silenciosa puede tener una  $K_D$  y/o semivida de unión para el complejo de GKYDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) HLA-A\*0201 o el complejo de GKYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A\*0201 dentro del 10% de la  $K_D$  y/o semivida de unión medidas del TCR correspondiente sin dicho(s) cambio(s), cuando se mide en condiciones idénticas (por ejemplo, a 25°C y en el mismo chip SPR). Las condiciones adecuadas se definen adicionalmente en el ejemplo 3. La especificidad de antígeno se define adicionalmente más adelante. Como saben los expertos en la técnica, se pueden producir TCR que incorporen cambios en los dominios constantes y/o variables de los mismos en comparación con los detallados antes sin alterar la afinidad por la interacción con el complejo de GKYDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) HLA-A\*0201 o el complejo de GKYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A\*0201. En particular, dichas mutaciones silenciosas se pueden incorporar dentro de partes de la secuencia que se sabe que no están directamente implicadas en la unión al antígeno (p. ej., fuera de las CDR). Dichas variantes triviales están incluidas en el alcance de esta invención. Los TCR en los que se han hecho una o más sustituciones conservadoras también forman parte de esta invención.

Las mutaciones se pueden llevar a cabo usando cualquier método adecuado, incluyendo, pero no limitado a los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación basada en enzimas de restricción o procedimientos de clonación independiente de ligado (LIC). Estos métodos se detallan en muchos de los textos de referencia de biología molecular. Para más detalles en relación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación basada en enzimas de restricción, véase Sambrook y Russell, (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3ª Ed.) CSHL Press. Se puede encontrar más información sobre los procedimientos de clonación independiente de ligado (LIC) en Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6 (1): 30-6.

Se ha encontrado que algunos TCR de la invención son muy adecuados para usar en terapia adoptiva. Dichos TCR pueden tener una  $K_D$  para el complejo menor de 200  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, de aproximadamente 0.05  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  y/o tener una semivida de unión ( $T_{1/2}$ ) para el complejo en el intervalo de aproximadamente 0.5 segundos a aproximadamente 12 minutos. En algunas realizaciones, los TCR de la invención pueden tener una  $K_D$  para el complejo de aproximadamente 0.05  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 0.1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  o de aproximadamente 0.1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ . Sin desear estar limitados por la teoría, parece que hay una ventana de afinidad óptima para los TCR con uso terapéutico en la terapia celular adoptiva. Los TCR de origen natural que reconocen epítopos de antígenos tumorales en general tienen una afinidad demasiado baja (20  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ) y los TCR de afinidad muy alta (en el intervalo nanomolar o mayor) sufren problemas de reactividad cruzada (Robbins et al. (2008) *J. Immunol.* 180 6116-6131; Zhao et al. (2007) *J. Immunol.* 179 5845-5854; Schmid et al. (2010) *J. Immunol.* 184 4936-4946).

Los TCR de la invención pueden ser heterodímeros  $\alpha\beta$  o pueden estar en formato de cadena sencilla. Los formatos de cadena sencilla incluyen polipéptidos de TCR  $\alpha\beta$  de los tipos  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$  o  $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ , en donde  $V\alpha$  y  $V\beta$  son las regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR respectivamente,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son las regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR respectivamente, y L es una secuencia conectora. Para usar como agente de direccionamiento para suministrar agentes terapéuticos a la célula presentadora de antígeno, el TCR puede estar en forma soluble (es decir, no tener dominios transmembrana o citoplasmáticos). Para la estabilidad, los TCR heterodímeros  $\alpha\beta$  solubles preferiblemente tienen un enlace disulfuro introducido entre restos de los respectivos dominios constantes, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Uno o ambos de los dominios constantes presentes en un heterodímero  $\alpha\beta$  de la invención pueden estar truncados en el extremo C o extremos C, por ejemplo, en hasta 15, o en hasta 10 o en hasta 8 o menos aminoácidos. Para usar en terapia adoptiva, un TCR heterodímero  $\alpha\beta$  se puede, por ejemplo, transfectar como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplasmáticos como transmembrana. Los TCR para usar en terapia adoptiva pueden contener un enlace disulfuro que corresponde al que se encuentra en la naturaleza entre los respectivos dominios constantes alfa y beta, adicional o alternativamente puede estar presente un enlace disulfuro no natural.

Como será obvio para los expertos en la técnica, puede ser posible trincar las secuencias proporcionadas en su extremo C y/o extremo N, en 1, 2, 3, 4, 5 o más restos, sin afectar sustancialmente a las características de unión del TCR. Todas dichas variantes triviales están abarcadas por la presente invención.

5 Los TCR heterodímeros alfa-beta de la invención normalmente comprenden una secuencia de dominio constante TRAC de la cadena alfa y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 de la cadena beta. Las secuencias de dominio constante de la cadena alfa y beta se pueden modificar por truncado o sustitución para eliminar el enlace disulfuro natural entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2. Las secuencias de dominio constante de la cadena alfa y beta también se pueden modificar por sustitución de la Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 por restos de cisteína, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del TCR.

15 La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio  $K_D$ ) y la semivida de unión (expresada como  $T_{1/2}$ ) se pueden determinar usando el método de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore) del ejemplo 3 de la presente memoria. Las mediciones se pueden llevar a cabo a 25°C y a un pH entre 7.1 y 7.5 usando una versión soluble del TCR. Se apreciará que duplicar la afinidad de un TCR da como resultado la reducción a la mitad de la  $K_D$ . La  $T_{1/2}$  se calcula como  $\ln 2$  dividido entre la constante de disociación ( $k_{off}$ ). Por lo tanto, duplicar la  $T_{1/2}$  da como resultado una reducción a la mitad de  $k_{off}$ . Los valores de  $K_D$  y  $k_{off}$  para los TCR normalmente se miden para las formas solubles del TCR, es decir, aquellas formas que se truncan para eliminar los restos del dominio transmembrana hidrófobo. Por lo tanto, debe entenderse que un TCR determinado cumple el requisito de que tiene una afinidad de unión y/o una semivida de unión para el complejo de GYVDGREHTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A2 y el complejo de GYVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2)-HLA-A2, si una forma soluble de ese TCR cumple ese requisito. Preferiblemente, la afinidad de unión o la semivida de unión de un TCR dado se mide varias veces, por ejemplo 3 o más veces, usando el mismo protocolo de ensayo, y se toma un promedio de los resultados. El TCR de referencia tiene una  $K_D$  de aproximadamente 17  $\mu M$  medido por ese método, y la  $T_{1/2}$  es aproximadamente 1.6S

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADNc. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de la cadena  $\alpha$  de un TCR de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena  $\beta$  de un TCR de la invención. El ácido nucleico puede ser de origen no natural y/o purificado y/o genéticamente modificado.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la invención. Preferiblemente el vector es un vector de expresión del TCR.

35 La invención también proporciona una célula que alberga un vector de la invención, preferiblemente un vector de expresión de TCR. El vector puede comprender el ácido nucleico de la invención que codifica en un solo marco de lectura abierto, o dos marcos de lectura abiertos distintos, la cadena alfa y la cadena beta respectivamente. Otro aspecto proporciona una célula que alberga 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. Dichas células son particularmente útiles en terapia adoptiva. Las células de la invención pueden ser aisladas y/o recombinantes y/o no naturales y/o genéticamente modificadas.

40 Puesto que los TCR de la invención tienen utilidad en terapia adoptiva, la invención incluye una célula de origen no natural y/o purificada y/o genéticamente modificada, en especial una linfocito T, que presenta un TCR de la invención. La invención también proporciona una población expandida de linfocitos T que presentan un TCR de la invención. Existe una serie de métodos adecuados para la transfección de linfocitos T con ácido nucleico (tal como ADN, ADNc o ARN) que codifica los TCR de la invención (véase, por ejemplo, Robbins et al., (2008) *J Immunol.* 180: 6116-6131). Las linfocitos T que expresan los TCR de la invención serán adecuados para usar en el tratamiento del cáncer basado en terapia adoptiva. Como sabrán los expertos en la técnica, hay una serie de 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).

50 Los TCR solubles de la invención son útiles para suministrar marcadores detectables o agentes terapéuticos a las células presentadoras de antígeno y a los tejidos que contienen las células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, se pueden asociar (de forma covalente o de otro modo) con un marcador detectable (para fines de diagnóstico en donde el TCR se usa para detectar la presencia de células que presentan el complejo GYVDGEEHSV (SEQ ID NO: 2) o GYVDGREHTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A2); un agente terapéutico; o un resto modificador de PK (por ejemplo, por PEGilación).

55 Los marcadores detectables para fines de diagnóstico incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste.

Los agentes terapéuticos que se pueden asociar con los TCR de la invención incluyen inmunomoduladores, compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (cisplatino, por ejemplo). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejerzan en el lugar deseado, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido

al TCR de modo que el compuesto sea liberado lentamente. Esto evitará efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y asegurará que la toxina tenga el efecto máximo después de la unión del TCR a las células presentadoras de antígeno relevantes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- 5 • agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de matar células de mamíferos que tienen un peso molecular menor de 700 Daltons. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Los ejemplos de dichos agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, rachelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, sorfimer de sodio fotofrina II, temozolomida, topotecán, glucuronato de trimetreato, auristatina E vincristina y doxorubicina;
- 10 • citotoxinas peptídicas, es decir, proteínas o sus fragmentos con la capacidad de matar células de mamíferos. Por ejemplo, ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de *Pseudomonas*, DNasa y RNasa;
- 15 • radionucleidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se descomponen con emisión simultánea de una o más partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ . Por ejemplo, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astato 213;
- se pueden usar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionucleidos con los TCR de alta afinidad, o multímeros de los mismos;
- 20 • inmunostimuladores, es decir, moléculas inmunoefectoras que estimulan la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, citoquinas tales como IL-2 e IFN- $\gamma$ ,
- Superantígenos y mutantes de los mismos;
- Fusiones de TCR-HLA;
- quimioquinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento del melanoma, etc.
- 25 • anticuerpos o fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos anti-determinante de linfocitos T o células NK (p. ej., anti-CD3, anti-CD28 o anti-CD16);
- armazones de proteínas alternativas con características de unión similares a los anticuerpos
- activadores del complemento;
- 30 • dominios de proteínas xenogénicas, dominios de proteínas alogénicas, dominios de proteínas virales/bacterianas, péptidos virales/bacterianos.

Se proporciona una realización preferida con un TCR de la invención asociado (normalmente por fusión a un extremo N o C de la cadena alfa o beta) con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo anti-CD3. Los fragmentos de anticuerpos y variantes/análogos que son adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen minicuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos dsFv y scFv, Nanobodies™ (estas construcciones, comercializadas por Ablynx (Bélgica), comprenden dominio pesado variable de inmunoglobulina sintética simple derivado de un anticuerpo de camélido (p. ej., camello o llama) y anticuerpos de dominio (Domantis (Bélgica), que comprende un dominio pesado variable de inmunoglobulina única madurada por afinidad o dominio ligero variable de inmunoglobulina) o armazones de proteínas alternativas que presentan características de unión como anticuerpos tales como Affibodies (Affibody (Suecia), que comprende el armazón de proteína A genéticamente modificada) o Anticalinas (Pieris (alemán), que comprende anticalinas genéticamente modificadas) por nombrar solo algunos.

35

40

Para algunos propósitos, los TCR de la invención se pueden añadir en un complejo que comprende varios TCR para formar un complejo de TCR multivalente. Hay una serie de proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que se puede usar en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha usado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpos scFv que presentaban una persistencia en suero aumentada y una constante de disociación significativamente reducida en comparación con el fragmento scFv monómero. (Willuda et al. (2001) *J. Biol. Chem* 276 (17) 14385-14392). La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que se podría usar potencialmente para este tipo de aplicación. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede tener una capacidad de unión mejorada para el complejo de GYVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A2 en comparación con un heterodímero de receptor de linfocitos T o de tipo natural no multimérico de la invención. Por lo tanto, los complejos multivalentes de TCR de la invención también se incluyen dentro de la invención. Dichos complejos de TCR multivalentes según la invención son particularmente útiles para rastrear o dirigirse a células que presentan antígenos particulares in vitro o in vivo, y también son útiles como productos

45

50

intermedios para la producción de complejos de TCR multivalentes adicionales que tienen dichos usos.

Como es bien conocido en la técnica, los TCR se pueden someter a modificaciones postraduccionales. La glucosilación es una de dichas modificaciones, que comprende la unión covalente de restos oligosacáridos a aminoácidos definidos en la cadena de TCR. Por ejemplo, los restos de asparagina o restos de serina/treonina son sitios bien conocidos para la unión de oligosacáridos. El estado de glucosilación de una proteína particular depende de una serie de factores, que incluyen la secuencia de la proteína, conformación de la proteína y la disponibilidad de ciertas enzimas. Además, el estado de glucosilación (es decir, tipo de oligosacárido, enlace covalente y número total de uniones) pueden influir en la función de la proteína. Por lo tanto, cuando se producen proteínas recombinantes, a menudo es deseable controlar la glucosilación. La glucosilación controlada se ha usado para mejorar la terapia basada en anticuerpos. (Jefferis R., *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Mar; 8 (3): 226-34). Para los TCR solubles de la invención, la glucosilación se puede controlar *in vivo*, usando líneas celulares particulares, por ejemplo, o *in vitro*, por modificación química. Dichas modificaciones son deseables, ya que la glucosilación puede mejorar la farmacocinética, reducir la inmunogenicidad y simular más estrechamente una proteína humana natural (Sinclair AM y Elliott S., *Pharm Sci.* 2005 Ago; 94(8): 1626-35).

Para la administración a pacientes, los TCR, ácidos nucleicos y/o células de la invención (normalmente asociados con un marcador detectable o agente terapéutico), se pueden proporcionar en una composición farmacéutica junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los TCR terapéuticos o de formación de imágenes de acuerdo con la invención normalmente 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). Se puede proporcionar en 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) incluirá instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

La composición farmacéutica se puede adaptar para la administración por cualquier vía adecuada, preferiblemente una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o preferiblemente intravenosa). Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

Las dosis de las sustancias de la presente invención pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la edad y estado del individuo que se va a tratar, etc. y un médico determinará en última instancia las dosis adecuadas para usar.

Los TCR, composiciones farmacéuticas, vectores, ácidos nucleicos y células de la invención se pueden proporcionar en forma sustancialmente pura, por ejemplo al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% puro.

La invención también proporciona:

- Un TCR, ácido nucleico o célula de la invención para usar en medicina, preferiblemente para usar en un método de tratamiento del cáncer, tal como tumores sólidos (p. ej., metástasis pulmonar, hepática y gástrica) y/o carcinomas de células escamosas.

- el uso de un TCR, ácido nucleico o célula de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

- un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar al paciente un TCR, ácido nucleico o célula de la invención.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*. Los documentos de la técnica anterior mencionados en la presente memoria se incorporan en la máxima extensión permitida por la ley.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos no limitantes.

Se hace referencia a las secuencias incluidas, en las que:

La SEQ ID NO: 1 es el péptido MAGE B2

La SEQ ID NO: 2 es el péptido MAGE A4

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la parte extracelular de la cadena alfa de un TCR específico de MAGE-A4 parental, y la SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la parte extracelular de la cadena beta de una secuencia de aminoácidos de la cadena beta de TCR específica de MAGE-A4 parental.

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de un TCR Lenti natural (denominado en la presente memoria "TCR de referencia"). La secuencia es la misma que la del TCR parental, excepto que se sustituye

T162 (es decir T48 de la región constante TRAC) por una cisteína. La SEQ ID NO: 6 es la cadena beta de un TCR Lenti natural (denominado en la presente memoria "TCR de referencia"). La secuencia es la misma que la del TCR parental, excepto que S169 (es decir S57 de la región constante TRBC2) se sustituye por cisteína y C187 se sustituye por A187 y N201 se sustituye por D201.

- 5 Las SEQ ID NO: 7, 8 y 9 muestran las secuencias de cadenas alfa que pueden estar presentes en los TCR de la invención. Las subsecuencias que forman las regiones CDR, o partes sustanciales de las regiones CDR, están subrayadas.

Las SEQ ID NO: 10-12 muestran la secuencia de la cadena beta que puede estar presente en los TCR de la invención. Las subsecuencias que forman las regiones CDR, o partes sustanciales de las regiones CDR están subrayadas.

- 10 Las SEQ ID NO: 13-18 muestran las secuencias de las cadenas alfa y beta de TCR que no podrían mejorarse mediante técnicas de mutación y selección de la presente solicitud.

### Ejemplos

Ejemplo 1 - Clonación de las secuencias de región variable de la cadena alfa y beta de TCR MAGE-A4 de referencia en plásmidos de expresión basados en pGMT7

- 15 Los dominios alfa variable de TCR MAGE-A4 parental y beta variable de TCR de SEQ ID NO: 3 y 4 respectivamente se clonaron en plásmidos de expresión basados en pGMT7 que contienen C $\alpha$  o C $\beta$  por métodos convencionales descritos en (Molecular Cloning a Laboratory Manual, Tercera edición, de Sambrook y Russell). Los plásmidos se secuenciaron usando un analizador de ADN 3730xl de Applied Biosystems. Los dominios alfa variable de TCR MAGE-A4 de referencia y beta variable de TCR de SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente se clonaron de la misma manera.
- 20 La secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena alfa de TCR se ligó en pEX956, que se cortó con enzimas de restricción. La secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena beta de TCR se ligó en pEXb21, que también se cortó con enzimas de restricción.

- 25 Los plásmidos ligados se transformaron en células competentes de la cepa de E. coli XL1-blue y se sembraron en placas de LB/agar que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Después de incubación durante la noche a 37°C, se recogieron colonias individuales y se cultivaron en 5 ml de LB que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml durante la noche a 37°C con agitación. Los plásmidos clonados se purificaron usando un kit Miniprep (Qiagen) y los plásmidos se secuenciaron usando un analizador de ADN 3730xl de Applied Biosystems.

Ejemplo 2 - Expresión, replegado y purificación de TCR MAGE-A4 de referencia soluble

- 30 Los plásmidos de expresión que contienen la cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$  del TCR de referencia, respectivamente, como se prepararon en el ejemplo 1, se transformaron por separado en la cepa de E. coli BL21pLysS, y se cultivaron colonias resistentes a ampicilina individuales a 37°C en medio TYP (ampicilina 100 g/ml) hasta OD<sub>600</sub> de ~0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0.5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción por centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en un Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (NovaGen) en presencia de MgCl<sub>2</sub> y DNasal. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y componentes de membrana. El sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizó cada vez en un tampón de Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, Triton-X100 al 0.5%, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de ser sedimentado por centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en un Beckman J2-21. Después se eliminó el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en partes alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70°C. El rendimiento de proteínas de cuerpos de inclusión se cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y se llevó a cabo una medición de OD en un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Después se calculó la concentración de proteína usando el coeficiente de extinción.

- 45 Aproximadamente 15 mg de cadena  $\alpha$  de TCR y 15 mg de cadena  $\beta$  de TCR de cuerpos de inclusión solubilizados se descongelaron de las reservas congeladas y se diluyeron en 10 ml de una disolución de guanidina (hidrocloruro de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM pH 8.1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 10 mM), para asegurar la desnaturalización completa de la cadena. La disolución de guanidina que contenía cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas después se inyectó en 0.5 litros del siguiente tampón de replegado: Tris 100 mM a pH 8.1, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, urea 5 M. La pareja de oxidorreducción (hidrocloruro de cisteamina y dihidrocloruro de cistamina) en concentraciones finales de 6.6 mM y 3.7 mM respectivamente, se añadió aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La disolución se dejó durante ~30 minutos. El TCR replegado se dializó en la membrana SpectraPor 1 (Spectrum; Producto N° 132670) contra 10 L de H<sub>2</sub>O durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces a Tris 10 mM de nueva aportación pH 8.1 (10 L) y la diálisis se continuó a 5°C  $\pm$  3°C durante otras ~8 horas.

- 55 El TCR soluble se separó de los productos de degradación y las impurezas cargando el replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en

Tris 10 mM a pH 8.1 con 50 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Se agruparon las fracciones de los picos y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem). Las fracciones agrupadas después se almacenaron a 4°C y se analizaron por SDS-PAGE teñida con Coomassie antes de agrupar y concentrar. Finalmente, el TCR soluble se purificó y caracterizó usando una columna de filtración en gel GE Healthcare Superdex 75HR preequilibrada en tampón de PBS (Sigma). El pico que eluía a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se agrupó y concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón de superficie BIAcore.

### Ejemplo 3 - Caracterización de la unión

#### Análisis con BIAcore

Se puede usar un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore 3000™) para analizar la unión de un TCR soluble a su ligando péptido-MHC. Esto se facilita por la producción de complejos de péptido-HLA biotinilados solubles ("pHLA") que se pueden inmovilizar en una superficie de unión recubierta con estreptavidina (chip de detección). Los chips de detección comprenden cuatro celdas de flujo individuales que permiten la medición simultánea de la unión del receptor de linfocitos T a cuatro complejos pHLA diferentes. La inyección manual del complejo pHLA permite manipular fácilmente el nivel preciso de las moléculas de clase I inmovilizadas.

Las moléculas HLA-A\*0201 de clase I biotiniladas se replegaron in vitro a partir de cuerpos de inclusión expresados de modo bacteriano que contienen las proteínas subunidades constituyentes y el péptido sintético, seguido de purificación y biotinilación enzimática in vitro (O'Callaghan et al. (1999) *Anal. Biochem.* 266: 9-15). HLA-A\*0201-cadena pesada se expresó con un marcador de biotinilación C-terminal que reemplaza los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en una construcción adecuada. Se obtuvieron niveles de expresión de cuerpos de inclusión de cultivo bacteriano de ~75 mg/litro. La cadena ligera de MHC o microglobulina  $\beta 2$  también se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de una construcción adecuada, en un nivel de cultivo bacteriano de ~500 mg/litro.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purificaron hasta aproximadamente 80% de pureza. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturalizó en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM a pH 8.1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, y se replegó en una concentración de cadena pesada de 30 mg/litro,  $\beta 2$  de 30 mg/litro en L-arginina 0.4 M, Tris 100 mM a pH 8.1, dicloruro de cistamina 3.7 mM, hidrocloreuro de cisteamina 6.6 mM, 4 mg/l del péptido MAGE-A4 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) o MAGE-B2 GVDYDGEHHSV (SEQ ID NO: 2) requerido para ser cargado por la molécula HLA-A\*02, por adición de un pulso único de proteína desnaturalizada en tampón de replegado a <5°C. Se permitió que el replegado se completara a 4°C durante al menos 1 hora.

El tampón se cambió por diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM a pH 8.1. Fueron necesarios dos cambios de tampón para reducir la fuerza iónica de la disolución lo suficiente. La disolución de proteína después se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 1.5  $\mu$ m y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ (volumen de lecho de 8 ml). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM a pH 8.1 usando un purificador Akta (GE Healthcare). El complejo de HLA-A\*0201-péptido eluyó con aproximadamente NaCl 250 mM, y se recogieron las fracciones de los picos, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Las moléculas de pHLA marcadas con biotina se intercambiaron en tampón en Tris 10 mM a pH 8.1, NaCl 5 mM usando una columna de desalación rápida de GE Healthcare equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente tras la elución, las fracciones que contenían proteínas se enfriaron en hielo y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem). Después se añadieron los reactivos de biotinilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8),  $MgCl_2$  7.5 mM y enzima BirA 5  $\mu$ g/ml (purificada de acuerdo con O'Callaghan et al. (1999) *Anal. Biochem.* 266: 9-15). La mezcla después se dejó incubar a temperatura ambiente durante la noche.

Las moléculas de pHLA-A\*0201 biotiniladas se purificaron usando cromatografía de filtración en gel. Se preequilibró una columna GE Healthcare Superdex 75 HR 10/30 con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción de biotinilación y la columna se desarrolló con PBS a 0.5 ml/min usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las moléculas pHLA-A\*0201 biotiniladas eluyeron como un pico único a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se agruparon, se enfriaron en hielo y se añadió cóctel de inhibidores de proteasa. La concentración de proteína se determinó usando un ensayo de unión-Coomassie (PerBio) y partes alícuotas de moléculas pHLA-A\*01 biotiniladas se almacenaron congeladas a -20°C.

Dichos complejos inmovilizados son capaces de unir tanto los receptores de linfocitos T como el co-receptor CD8 $\alpha$ , los cuales pueden inyectarse en la fase soluble. Se observa que las propiedades de unión a pHLA de los TCR solubles son cualitativa y cuantitativamente similares si el TCR se usa en la fase soluble o inmovilizada. Este es un control importante para la actividad parcial de especies solubles y también sugiere que los complejos de pHLA biotinilados son biológicamente tan activos como los complejos no biotinilados.

El biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) BIAcore 3000™ mide los cambios en el índice de refracción expresado en unidades de respuesta (RU) cerca de la superficie de un sensor dentro de una celda de flujo pequeña, un principio que se puede usar para detectar interacciones de ligando y receptor y analizar su afinidad y

parámetros cinéticos. Los experimentos de BIAcore se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C, usando tampón de PBS (Sigma, pH 7.1 -7.5) como tampón de ejecución y en la preparación de diluciones de muestras de proteínas. La estreptavidina se inmovilizó en las celdas de flujo por métodos de acoplamiento de amina convencionales. Los complejos de pHLA se inmovilizaron mediante el marcador de biotina. Después, el ensayo se llevó a cabo pasando TCR soluble sobre las superficies de las diferentes celdas de flujo con un caudal constante, midiendo la respuesta de SPR al hacerlo.

#### Constante de equilibrio de la unión

Los métodos de análisis de BIAcore anteriores se usaron para determinar las constantes de equilibrio de la unión. Se prepararon diluciones seriadas de la forma heterodímera soluble ligada por disulfuro del TCR MAGE-A4 de referencia y se inyectaron con un caudal constante de 5  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  en dos celdas de flujo diferentes; una recubierta con ~1000 RU de complejo de GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A\*0201, la segunda recubierta con ~1000 RU de complejo no específico. La respuesta se normalizó para cada concentración usando la medición de la celda de control. La respuesta de datos normalizados se representó gráficamente frente a la concentración de la muestra de TCR y se ajustó a un modelo de ajuste de curva no lineal con el fin de calcular la constante de equilibrio de unión,  $K_D$ . (Price y Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª Edición) 1979, Clarendon Press, Oxford). La forma soluble unida por disulfuro del TCR MAGE-A4 de referencia (Ejemplo 2) demostró una  $K_D$  de aproximadamente 2.00  $\mu\text{M}$ . A partir de los mismos datos de BIAcore, la  $T_{1/2}$  era de aproximadamente 0.95 s.

#### Parámetros cinéticos

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

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

Se inyectó TCR en dos celdas diferentes, una recubierta con ~1000 RU de complejo específico GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A\*0201, la segunda recubierta con ~1000 RU de complejo no específico. El caudal se estableció en 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Típicamente se inyectaron 250  $\mu\text{l}$  de TCR en concentración ~1  $\mu\text{M}$ . Después se hizo pasar tampón hasta que la respuesta había vuelto al valor inicial o habían transcurrido >2 horas.

Los parámetros cinéticos se calcularon usando el software BIAevaluation. La fase de disociación se ajustó a una ecuación de disminución exponencial individual que permitían el cálculo de la semivida.

#### Ejemplo 4 - Preparación de TCR de alta afinidad de la invención

Se prepararon plásmidos de expresión que contenían la cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$  de TCR respectivamente como en el ejemplo 1:

ID TCR	SEQ ID NO cadena alfa	SEQ ID NO cadena beta
TCR1 (parental)	3	4
TCR2	7	4
TCR3	8	4
TCR4	3	9
TCR5	3	10
TCR6	3	11
TCR7	3	12

Los plásmidos se transformaron por separado en la cepa de E. coli BL21pLysS y se cultivaron colonias resistentes a ampicilina individuales a 37°C en medio TYP (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hasta  $\text{OD}_{600}$  de ~0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0.5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción por centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en un Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (Novagen) en presencia de  $\text{MgCl}_2$  y DNaseI. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y componentes de membrana. El sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizó cada vez en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, Triton-X100 al 0.5%, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de ser sedimentado por centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en un Beckman J2-21. Después se eliminaron el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, NaEDTA 1 mM. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en partes alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70°C. El rendimiento de proteínas de los cuerpos de inclusión se cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y se realizó una medición de OD en un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Después la concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción.

5 Aproximadamente 10 mg de cadena  $\alpha$  de TCR y 10 mg de cadena  $\beta$  de TCR de cuerpos de inclusión solubilizados para cada TCR de la invención se diluyeron en 10 ml de una disolución de guanidina (hidrocloruro de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM a pH 8.1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 10 mM), para asegurar la desnaturalización completa de cadenas. La disolución de guanidina que contenía cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas después se inyectó en 0.5 litros del siguiente tampón de replegado: Tris 100 mM a pH 8.1, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, urea 5 M. Se añadió la pareja de oxidorreducción (hidrocloruro de cisteamina y dihidrocloruro de cistamina) en concentraciones finales de 6.6 mM y 3.7 mM respectivamente, aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La disolución se dejó durante ~30 minutos. El TCR replegado se dializó en la membrana SpectraPor 1 (Spectrum; Producto N° 132670) contra 10 L de H<sub>2</sub>O durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces a Tris 10 mM a pH 8.1 de nueva aportación (10 L) y la diálisis se continuó a 5°C  $\pm$  3°C durante otras ~8 horas.

15 El TCR soluble se separó de los productos de degradación y las impurezas cargando el replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM a pH 8.1 con 15 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones agrupadas se almacenaron a 4°C y se analizaron por SDS-PAGE teñida con Coomassie antes de agrupar y concentrar. Finalmente, los TCR solubles se purificaron y caracterizaron usando una columna de filtración en gel GE Healthcare Superdex 75HR preequilibrada en tampón de PBS (Sigma). El pico que eluía a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se agrupó y concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón de superficie BIAcore.

20 Los perfiles de afinidad de los TCR así preparados para el epítipo MAGE-A4 o el epítipo MAGE-B2 se evaluaron usando el método del ejemplo 3, y se compararon con el TCR de referencia. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

	MAGE A4 K <sub>D</sub> ( $\mu$ M)	MAGE-B2 K <sub>D</sub> ( $\mu$ M)
Referencia (TCR1)	65.1	17
TCR2	6.8	2.1
TCR3	7.6	1.7
TCR4	3.15	0.15
TCR5	14.2	6.4
TCR6	1.349	0.348
TCR7	1.65	6.227

25 También se hicieron intentos para preparar TCR de alta afinidad basados en combinaciones de SEQ ID NO 13/14, 15/16, 17/18.

En el caso de TCR A, que combina la cadena alfa de SEQ ID NO 13 y la cadena beta de SEQ ID NO 14, se observó reactividad cruzada entre MAGE-A1, MAGE-A10 y PRAME. No fue posible eliminar esta reactividad cruzada por mutación y selección.

30 El TCR B combina la cadena alfa de SEQ ID NO 15 y la cadena beta de SEQ ID NO 16. El TCR B no se pudo plegar para formar un TCR soluble, por lo que no fue posible la caracterización de unión.

El TCR C combina la cadena alfa de SEQ ID NO 17 y la cadena beta de SEQ ID NO 18. Este TCR era soluble cuando se expresaba y se podía unir al antígeno. Sin embargo, cuando se expresa en linfocitos T, el TCR C no mostraba actividad.

#### Ejemplo 5 - Transfección de linfocitos T con TCR MAGE-A4 parentales y variantes

35 (a) Preparación del vector lentiviral por transfección transitoria mediada por Express-In de células 293T

40 Se usó un sistema de empaquetamiento lentiviral de 3<sup>a</sup> generación para empaquetar vectores lentivirales que contenían el gen que codifica el TCR deseado. Células 293T se transfectaron con 4 plásmidos (un vector lentiviral que contenía el gen del ORF individual de cadena alfa TCR-P2A-cadena beta TCR descrito en el ejemplo 5c (a continuación), y 3 plásmidos que contenían los otros componentes necesarios para construir partículas lentivirales infecciosas pero no replicativas) usando la transfección mediada por Express-In (Open Biosystems).

45 Para la transfección, se tomó un matraz T150 de células 293T en fase de crecimiento exponencial, con células distribuidas uniformemente en la placa, y un poco más del 50% de confluencia. Partes alícuotas de Express-In se llevaron a temperatura ambiente. Se colocaron 3 ml de medio sin suero (RPMI 1640 + HEPES 10 mM) en un tubo cónico estéril de 15 ml. Se añadieron 174  $\mu$ l de reactivo Express-In directamente al medio sin suero (esto proporciona una relación en peso de 3.6:1 de reactivo a ADN). Esto se mezcló completamente invirtiendo los tubos 3-4 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5-20 minutos.

En un microtubo separado de 1.5 ml, se añadieron 15 µg de ADN de plásmido a partes alícuotas de mezcla de empaquetamiento premezcladas (que contenían 18 µg de pRSV.REV (plásmido de expresión Rev), 18 µg de pMDLg/p.RRE (plásmido de expresión Gag/Pol), 7 µg de pVSV-G (plásmido de expresión de glucoproteína VSV), normalmente ~22 µl, y se pipeteó hacia arriba y hacia abajo para asegurar la homogeneidad de la mezcla de ADN.

5 Se añadió aproximadamente 1 ml de Express-In/medio sin suero a la mezcla de ADN gota a gota, después se pipeteó hacia arriba y hacia abajo suavemente antes de volver a transferir al resto del Express-In/medio sin suero. El tubo se invirtió 3-4 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. El medio de cultivo antiguo se retiró del matraz de células. El complejo de Express-In/medio/ADN (3 ml) se añadió directamente al fondo de un matraz vertical de células 293T. Lentamente, el matraz se colocó plano para cubrir las células y se balanceó muy suavemente para asegurar la distribución uniforme. Después de 1 minuto, se añadieron 22 ml de medio de cultivo de nueva aportación (R10+HEPES: RPMI 1640, FBS inactivado por calor al 10%, Pen/Estrep/L-glutamina al 1%, HEPES 10 mM) y el matraz se devolvió cuidadosamente al incubador. Este se incubó durante la noche a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, se recogió el medio que contenía los vectores lentivirales empaquetados.

15 Para recoger los vectores lentivirales empaquetados, el líquido sobrenadante del cultivo celular se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 micrómetros, el medio de cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 18 horas (o 112 000 g durante 2 horas), se separó la mayor parte del líquido sobrenadante (teniendo cuidado de no alterar el sedimento) y el sedimento se resuspendió en los pocos ml restantes de líquido sobrenadante (normalmente aproximadamente 2 ml de un volumen inicial de 31 ml por tubo). Esto se congeló instantáneamente en hielo seco en partes alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -80°C.

20 (b) Transducción de linfocitos T con vectores lentivirales empaquetados que contienen gen de interés

Antes de la transducción con los vectores lentivirales empaquetados, se aislaron linfocitos T humanas (CD8 o CD4 o ambos dependiendo de los requisitos) de la sangre de voluntarios sanos. Estas células se contaron e incubaron durante la noche en R10 que contenía 50 U/ml de IL-2 con  $1 \times 10^6$  células por ml (0.5 ml/pocillo) en placas de 48 pocillos con microperlas recubiertas con anticuerpo anti-CD3/CD28 prelavadas (Dynabeads® T cell Expander, Invitrogen) en una proporción de 3 perlas por célula.

Después de estimulación durante la noche, se añadieron 0.5 ml de vector lentiviral empaquetado puro a las células deseadas. Esto se incubó a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días. 3 días después de transducción, las células se contaron y se diluyeron a  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Se añadió medio de nueva aportación que contenía IL-2 según fuera necesario. Las perlas se retiraron 5-7 días después de la transducción. Se contaron las células y se reemplazó o añadió medio nuevo que contenía IL-2 en intervalos de 2 días. Las células se mantuvieron entre  $0.5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se analizaron por citometría de flujo desde el día 3 y se usaron para ensayos funcionales (p. ej. ELISpot para la liberación de IFN $\gamma$ , véase el ejemplo 6) desde el día 5. Desde el día 10, o cuando las células disminuyen la división y reducen su tamaño, las células se congelan en partes alícuotas de al menos  $4 \times 10^6$  células/vial (a  $1 \times 10^7$  células/ml en 90% de FBS/10% de DMSO) para almacenamiento.

35 Ejemplo 6 - Activación de linfocitos T genéticamente modificados con TCR MAGE B2

El siguiente ensayo se llevó a cabo para demostrar la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) transducidos con TCR en respuesta a líneas celulares tumorales. La producción de IFN- $\gamma$ , medida con el ensayo ELISPOT, se usó como lectura para la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL).

ELISPOT

40 Reactivos

Medios de ensayo: 10% de FCS (Gibco, n° cat 2011-09), 88% de RPMI 1640 (Gibco, n° cat 42401), 1% de glutamina (Gibco n° cat 25030) y 1% de penicilina/estreptomina (Gibco n° cat 15070-063).

Tampón de lavado: PBS 0.01 M/Tween 20 al 0.05%

PBS (Gibco n° cat 10010)

45 El kit de ELISPOT de IFN $\gamma$  humano (BD Bioscience; n° cat 551849) que contiene anticuerpos de captura y detección y placas de 96 pocillos de PVDF ELISPOT de IFN- $\gamma$  humano, con un conjunto de sustrato AEC asociado (BD Bioscience, n° cat 551951)

Métodos

Preparación de células objetivo

50 Las células objetivo usadas en este método eran células presentadoras de epítopos naturales: células de melanoma humano A375 que son tanto HLA-A2+ como MAGE A4+. Se usaron HCT116 de cáncer de colon humano, que son HLA-A2+ MAGE A4+, como control negativo. Se lavaron suficientes células objetivo (50 000 células/pocillo) por centrifugación tres veces a 1200 rpm, 10 minutos en un Megafuge® 1.0 (Heraeus). Después las células se volvieron

a suspender en medio de ensayo a  $10^6$  células/ml.

Preparación de células efectoras

5 Las células efectoras (linfocitos T) usadas en este método eran linfocitos de sangre periférica (PBL), obtenidos por selección negativa usando kits de microperlas CD14 y CD25 (Miltenyi Biotech n° cat 130-050-201 y 130-092-983 respectivamente) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas de la sangre venosa de voluntarios sanos. Las células se estimularon con perlas recubiertas con antiCD3/CD28 (Dynabeads® T cell Expander, Invitrogen), se transdujeron con lentivirus que llevaba el gen que codifica el TCR  $\alpha\beta$  completo de interés (basado en la construcción descrita en el ejemplo 5) y se expandió en medio de ensayo que contenían 50 U/ml de IL-2 hasta entre 10 y 13 días después de transducción. Estas células después se pusieron en medio de ensayo antes de lavarlo por centrifugación a 1200 rpm, 10 minutos en un Megafuge® 1.0 (Heraeus). Después, las células se resuspendieron en medio de ensayo a 4X la concentración final requerida.

15 Las placas se prepararon como sigue: se diluyeron 100  $\mu$ l de anticuerpo de captura anti-IFN- $\gamma$  en 10 ml de PBS estéril por placa. Después se dispensaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura diluido en cada pocillo. Las placas después se incubaron durante la noche a 4°C. Después de la incubación, las placas se lavaron (programa 1, placa tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) para eliminar el anticuerpo de captura. Después las placas se bloquearon por adición de 200  $\mu$ l de medio de ensayo a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después el medio de ensayo se lavó de las placas (programa 1, placa tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) y cualquier medio restante se retiró sacudiendo y dando golpecitos a las placas de ELISPOT sobre una toalla de papel.

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

50  $\mu$ l de células objetivo  $10^6$  células/ml (dando un total de 50 000 células objetivo/pocillo)

50  $\mu$ l de medio (medio de ensayo)

50  $\mu$ l de células efectoras (20 000 células PBL transducidas con TCR/pocillo)

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

35 La detección secundaria se llevó a cabo añadiendo 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP diluida a cada pocillo e incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. La estreptavidina-HRP se diluyó en 10 ml de tampón de dilución (el volumen requerido para una sola placa), usando la dilución especificada en las instrucciones del fabricante. Después las placas se lavaron tres veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placas de 96 pocillos Ultrawash Plus, Dynex) con tampón de lavado y se dieron golpecitos sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Las placas después se lavaron dos veces con PBS añadiendo 200  $\mu$ l a cada pocillo, sacudiendo el tampón y dando golpecitos sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón. No más de 15 minutos antes del uso, se añadió una gota (20  $\mu$ l) de cromógeno AEC a cada 1 ml de sustrato de AEC y se mezcló. Se prepararon 10 ml de esta disolución para cada placa; se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo. Después, la placa se protegió de la luz con papel de aluminio, y el desarrollo de las manchas se controló regularmente, produciéndose normalmente en 5 - 20 min. Las placas se lavaron en agua corriente para terminar la reacción en desarrollo y se sacudieron para secar antes de desmontarlas en tres partes constituyentes. Después se dejó que las placas se secaron a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de contar las manchas usando un lector de placas Immunospot® (CTL; Cellular Technology Limited).

45 Ejemplo 7 - Identificación del motivo de unión por sustitución con todos los aminoácidos alternativos.

Se obtuvieron variantes del péptido MAGE-B2 natural en las que el resto de aminoácido en cada posición se sustituyó secuencialmente por los 19 aminoácidos naturales alternativos, de modo que se prepararon 171 péptidos en total. Los péptidos con aminoácidos naturales y sustituidos se pulsaron sobre células presentadoras de antígeno, y la producción de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), medida usando el ensayo ELISpot, se usó como una lectura para la activación de linfocitos T transducidos con TCR2. Las posiciones esenciales se definieron por una reducción de más de 50% en la actividad de los linfocitos T en relación con el péptido natural.

Los ensayos ELISpot se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 6.

55 Los restos tolerados en cada posición del péptido se muestran a continuación. Los aminoácidos subrayados representan el resto natural en la posición correspondiente en el péptido.

ES 2 788 188 T3

Posición	Restos tolerados
1	<u>G</u>
2	<u>VI</u>
3	<u>WFY</u>
4	<u>D</u>
5	<u>GN</u>
6	CDMAGSETQFKVLIHNR (SEQ ID NO: 29)
7	YSWTFQMHLPLANGDICE (SEQ ID NO: 30)
8	FWVLMAYRKCTIQSHGPN (SEQ ID NO: 31)
9	VNLPMTKQRIYWSAFEGH (SEQ ID NO: 32)
10	FMVAILT (SEQ ID NO: 33)

Por lo tanto es evidente que los TCR2 MAGE B2 se ponen en contacto con al menos V2 Y3 y D4 del péptido (SEQ ID NO: 1) cuando forma complejo con HLA-A\*0201 en la superficie de células presentadoras de antígeno.

SEQ ID NO: 1 Epítipo MAGE A4

GVYDGREHTV

SEQ ID NO: 2 Epítipo MAGE B2

GVYDGEEHSV

SEQ ID NO: 3 cadena variable alfa

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSSENTKS  
NGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

SEQ ID NO: 4 cadena variable beta

MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP  
GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCATSGQGAYN  
EQFF

SEQ ID NO: 5 forma soluble de la cadena alfa

MKKHLTFLVILWLYFYRGNKGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQD  
TGRGPVSLTIMTFSSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSW  
GKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYI  
TDKTVLDMRSMDFKSNNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESS

SEQ ID NO: 6 forma soluble de la cadena beta

MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP  
GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCATSGQGAYN  
EQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWW  
NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE  
NDEWTQDRAKPVTVQVSAEAWGRAD

SEQ ID NO: 7 cadena variable alfa mutante

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIVTFSSENTKSN  
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

SEQ ID NO: 8 cadena variable alfa mutante

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTITTFSENTKSN  
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

SEQ ID NO: 9 cadena variable alfa mutante

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTINTFSENTKSN  
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

SEQ ID NO: 10 cadena variable beta mutante

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP  
GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCCATSGQGAYV  
EQFF

SEQ ID NO: 11 cadena variable beta mutante

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP  
GLGLRLIYYAFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCCATTGQGAYN  
EQFF

SEQ ID NO: 12 cadena variable beta mutante

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP  
GLGLRLIYYAFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCCATTGQGAYE  
EQFF

SEQ ID NO: 13 forma soluble de la cadena alfa

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPAAHSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG  
KGLTSLLIQSSQREQTSGRNLNASLKDSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVGGYSTLTFG  
KGTVLLVSPDNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVL  
DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTN  
LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 14 forma soluble de la cadena beta

MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDP  
GMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYSRW  
SPLHFGNGTRLTVTEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW  
VNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS  
ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS  
ALVLMAMVKRKDF

SEQ ID NO: 15 forma soluble de la cadena alfa

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKED  
GRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVKMANQAGTALIFGKGTTLSVSSNIQNP  
DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVA  
WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS

## ES 2 788 188 T3

SEQ ID NO: 16 forma soluble de la cadena beta

MQDGGITQSPKFQVLRTGQSMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITD  
QGEVPNGYNVSRLNKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASLGGLADEQFFGPGTRTLVLEDL  
KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQP  
LKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI  
VSAEAWGRAD

SEQ ID NO: 17 forma soluble de la cadena alfa

MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE  
PGAGLQLLYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAERNSGAGS  
YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT  
DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF  
ETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 18 forma soluble de la cadena beta

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTL  
GQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLFS  
GVNTEAFFGQGTRTLVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL  
SWWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPARNHFRQCQVQF  
YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA  
VLVSALVLMAMVKRKDF

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a GGYDGEESHV (SEQ ID NO: 1) en complejo con HLA-A\*0201 y GVDGREHTV (SEQ ID NO: 2) en complejo con HLA-A\*0201, con una constante de disociación de aproximadamente 0.05  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20.0  $\mu\text{M}$  cuando se mide con resonancia de plasmón de superficie a 25°C y a un pH entre 7.1 y 7.5 usando una forma soluble del TCR, en donde el TCR comprende un dominio variable de la cadena alfa de TCR y un dominio variable de la cadena beta de TCR, y en donde los dominios variables de TCR forman contactos con al menos los restos V2, Y3 y D4 de GGYDGEESHV (SEQ ID NO: 1).
2. Un TCR según la reivindicación 1, que es un heterodímero alfa-beta, que tiene una secuencia de dominio constante TRAV10 + TRAC de cadena alfa y una secuencia de dominio constante TRBV24-1 + TRBC-2 de cadena beta.
- 10 3. Un TCR según la reivindicación 1, que está en un formato de cadena sencilla del tipo  $V\alpha\text{-L-V}\beta$ ,  $V\beta\text{-L-V}\alpha$ ,  $V\alpha\text{-C}\alpha\text{-L-V}\beta$ , o  $V\alpha\text{-L-V}\beta\text{-C}\beta$ , en donde  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR respectivamente,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son regiones constantes  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR respectivamente, y L es una secuencia conectora.
4. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, que se asocia con un marcador detectable, un agente terapéutico o un resto modificador de la PK.
- 15 5. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio variable de la cadena alfa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-105 de la SEQ ID NO: 3, que puede tener la siguiente mutación:

CDR2 M4	V
CDR3 S4	T
CDR3 S4	N

en relación con la numeración mostrada en la SEQ ID NO: 3, y/o

- 20 un dominio variable de la cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-123 de la SEQ ID NO: 4,
- que puede tener al menos una de las siguientes mutaciones:

CDR2 S1	A
CDR3 S4	T
CDR3 N10	E
CDR3 N10	G
CDR3 N10	V

en relación con la numeración mostrada en la SEQ ID NO: 4.

6. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio variable de la cadena alfa comprende la secuencia de aminoácidos de los restos de aminoácidos 1-105 de la SEQ ID NO: 3 o 7-9 o
- 25 una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 54-90 de la misma tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 54-90 respectivamente de la SEQ ID NO: 3 o 7-9 y en la que los restos de aminoácidos 28-34, 48-53 y 91-105 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 28-33, 48-53 y 91-105 respectivamente de la SEQ ID NO: 3 o 7-9.
- 30 7. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el dominio variable de la cadena alfa comprende la secuencia de aminoácidos de restos de aminoácidos 1-105 de la SEQ ID NO: 7-9 o una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 55-89 de la misma tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-27, 34-47 y 55-89 respectivamente de la SEQ ID NO: 7-9 y en la que los restos de aminoácidos 28-33, 48-53 y 91-105 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 28-33, 48-53 y 91-105 respectivamente de la SEQ ID NO: 7-9.
- 35 8. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, en donde en el dominio variable de la cadena alfa la secuencia de
- (i) los restos de aminoácidos 1-27 de la misma tiene (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-26 de la SEQ ID NO: 3, o (b) tiene uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- 40 (ii) los restos de aminoácidos 28-33 es VSPFSN;
- (iii) los restos de aminoácidos 34-47 de la misma tiene (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 34-47 de la SEQ ID NO: 3, o (b) tiene uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);

- (iv) los restos de aminoácidos 48-53 es LTIMTF o LTMIVTF
- (v) los restos de aminoácidos 54-90 de la misma tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 55-89 de la SEQ ID NO: 3 o tiene una, dos o tres inserciones, eliminaciones o sustituciones con respecto a la misma;
- 5 (vi) los aminoácidos 91-105 es CVVSGGTDSWGKLFQ o CVVTGGTDSWGKLFQ
9. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio variable de la cadena beta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 10-12 o una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos 1-45, 51-67, 74-109 de la misma tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 1-45, 51-67, 74-109 respectivamente de la SEQ ID NO: 4 o 10-12 y en la que los restos de aminoácidos
- 10 46-50, 68-73 y 109-123 tienen al menos 90% o 95% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 46-50, 68-73 y 109-123 respectivamente de la SEQ ID NO: 4 o 10-12.
10. Un TCR según cualquier reivindicación precedente, en donde en el dominio variable de la cadena beta, la secuencia de
- 15 (i) los restos de aminoácidos 1-45 de la misma tiene (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los restos 1-26 de la SEQ ID NO: 4, o (b) tiene uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- (ii) los restos de aminoácidos 46-50 es KGHDR o KGRDR
- (iii) los restos de aminoácidos 51-67 de la misma tiene (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de restos de aminoácidos 51-67 de la SEQ ID NO: 4, o (b) tiene uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o
- 20 eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- (iv) los restos de aminoácidos 68-73 es SFDVK;
- (v) los restos de aminoácidos 54-90 de la misma tiene (a) al menos 90% de identidad con la secuencia de los restos de aminoácidos 54-90 de la SEQ ID NO: 4, o (b) tiene uno, dos o tres restos de aminoácidos insertados o eliminados con respecto a la secuencia de (a);
- 25 (vi) los aminoácidos 110-23 es CATSGQGAYNEQFF o CATNGQGAYREQFF o CATSGQGAYGEQFF o CATSGQGAYVEQFF
11. Ácido nucleico que codifica un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
12. Una célula aislada o de origen no natural, en especial un linfocito T, que presenta un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 30 13. Una célula que alberga
- (a) un vector de expresión de TCR que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 12 en un solo marco de lectura abierto, o en dos marcos de lectura abiertos distintos que codifican la cadena alfa y la cadena beta respectivamente; o
- 35 (b) un primer vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica la cadena alfa de un TCR según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un segundo vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica la cadena beta de un TCR según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Una composición farmacéutica que comprende un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el ácido nucleico de la reivindicación 11 o una célula según la reivindicación 12 o reivindicación 13, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 40 15. El TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el ácido nucleico de la reivindicación 13 o la célula de la reivindicación 14 o reivindicación 15 para usar en medicina.
16. El TCR, ácido nucleico o célula para usar según la reivindicación 15, para usar en un método de tratamiento del cáncer.