

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0611326-5 A2**

(22) Data de Depósito: 31/05/2006
(43) Data da Publicação: 31/08/2010
(RPI 2069)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/705

(54) Título: **RECEPTORES DE CÉLULAS T MELANO-A DE ALTA AFINIDADE**

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2005 GB 05 11124.0

(73) Titular(es): MEDIGENE LTD.

(72) Inventor(es): BENT KARSTEN JAKOBSEN, NATHANIEL ROSS LIDDY

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT GB2006001980 de 31/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/129085 de 07/12/2006

(57) Resumo: RECEPTORES DE CÉLULAS T MELANO-A DE ALTA AFINIDADE. A presente invenção fornece TCRs com uma afinidad (KD) me- nor ou igual a 3 μ M, e/ou uma taxa de separação (k0ff) de 1×10^{-3} ou mais baixa, para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*O2O1. Estes TC Rs são ú- teis, seja isolados ou associados com um agente terapêutico, para atacar células cancerosas presentes nesse complexo.

Pi 0611326-5

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "RECEPTORES DE CÉLULAS T MELANO-A DE ALTA AFINIDADE".

A presente invenção refere-se a receptores de células-T (TCRs) com a propriedade de se ligar a AAGIGILTV-HLA-A*0201 e compreendendo pelo menos um domínio variável da cadeia α do TCR e/ou pelo menos um domínio variável da cadeia β do TCR caracterizado pelo fato de o referido TCR ter um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor ou igual a 3 μM e/ou uma taxa de separação (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ou mais baixa.

Antecedentes da Invenção

O peptídeo AAGIGILTV deriva da proteína melano-A (Mart-1) que é expressa pela maioria das amostras novas de melanoma e por aproximadamente 60% das linhagens celulares de melanoma, assim como de melanócitos normais. ((Coulie *et al.*, (1994) *J. Exp. Med.* **180**: (1) 1-4) e Kawakami *et al.*, (1994) *PNAS USA* **91**: 3515). As moléculas de HLA classe I destas células cancerosas apresentam peptídeos desta proteína, incluindo o AAGIGILTV (SEQ ID N° 43) (Melano-A₂₇₋₃₅). O complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 parece ser um alvo imunodominante para células-T específicas para melanoma. ((Kawakami *et al.*, (1994) *PNAS USA* **91**: 3515) e (Rivoltini *et al.*, (1995) *J. Immunol* **154**: 2257). Portanto, este complexo peptídeo-HLA oferece um marcador de câncer que pode ser vetorizado por TCRs, por exemplo com a finalidade de distribuir agentes citotóxicos ou imunoestimulantes para as células cancerosas. No entanto, para tanto seria desejável que o TCR tivesse uma afinidade mais alta e/ou uma taxa de separação mais baixa para o complexo peptídeo-HLA que os TCRs nativos específicos para esse complexo.

25 Breve Descrição da Invenção

Esta invenção coloca à disposição pela primeira vez TCRs com alta afinidade (K_D) da interação menor ou igual a 3 μM e/ou uma taxa de separação ("off-rate") (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ou mais baixa para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201. Tais TCRs são úteis, seja isolados ou associados com um agente terapêutico, para atacar células cancerosas apresentando aquele complexo.

30 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção fornece um receptor de células-T (TCR) com a propriedade de se ligar a AAGIGILTV-HLA-A*0201 e compreendendo pelo menos um domínio variável da cadeia α do TCR e/ou pelo menos um domínio variável da cadeia β do TCR caracterizado pelo fato de o referido TCR ter um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor ou igual a 3 μM e/ou uma taxa de separação ("off-rate") (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ou mais baixa.

Em uma outra modalidade da presente invenção os referidos TCRs têm um K_D para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor ou igual a 1 μM .

A medição do K_D pode ser feita por qualquer um dos métodos conhecidos. Um método preferido é o método de ressonância de plasmônio de superfície (Biacore) do exemplo 4.

A título de comparação, a interação de uma variante solúvel ligada por dissulfeto do TCR MEL nativo (vide SEQ ID N° 9 para a cadeia α do TCR e SEQ ID N° 10 para a cadeia β do TCR) e do complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 tem um K_D de aproximadamente 4 μM medido pelo método básico da Biacore do exemplo 4.

O TCR MEL nativo específico para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 possui o emprego a seguir do gene de cadeia V-alfa e V-beta (usando a terminologia do T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc & LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8, vide abaixo):

Cadeia-alfa: - TRAV 12-2

Cadeia-beta: - TRBV 30

O TCR MEL nativo pode ser usado como um gabarito no qual podem ser introduzidas várias mutações que conferem alta afinidade e/ou baixa taxa de separação para a interação entre os TCRs da invenção e o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201. Assim sendo a invenção inclui TCRs que são alterados em relação à região variável da cadeia α (vide figura 1a e SEQ ID N° 1) em relação à região variável da cadeia β (vide figura 1b e SEQ ID N° 2) do TCR MEL nativo em pelo menos uma região determinadora de complementaridade (CDR) e/ou uma região de estrutura da região variável

do mesmo. Também é considerado que outras regiões hipervariáveis nas regiões variáveis dos TCRs da invenção, tais como as regiões hipervariáveis 4 (HV4), podem ser alteradas para produzir um mutante de alta afinidade.

Os TCRs nativos existem nas formas heterodiméricas $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. No entanto, já foi mostrado que TCRs recombinantes consistindo em uma única cadeia α de TCR ou em uma única cadeia β de TCR se ligam às moléculas MHC do peptídeo.

Em uma modalidade o TCR da invenção compreende um domínio variável da cadeia α e um domínio variável da cadeia β de TCR.

Como será óbvio para os versados na técnica as mutações na seqüência da cadeia α do TCR e/ou na seqüência da cadeia β do TCR podem ser uma ou mais substituições, deleções ou inserções. Estas mutações podem ser efetuadas usando qualquer método apropriado que inclui, porém sem limitação, aqueles baseados na reação de cadeia de polimerase (PCR), clonagem baseada em enzimas de restrição, ou procedimentos de clonagem independente da ligação (LIC). Estes métodos estão descritos em detalhes em muitos dos textos tradicionais de biologia molecular. Para maiores detalhes referentes à mutagênese por reação de cadeia de polimerase (PCR) e clonagem baseada em enzimas de restrição vide (Sambrook & Russell, (2001) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual* (3rd Ed.) CSHL Press). Outras informações sobre procedimentos de LIC podem ser encontradas em (Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6 (1): 30-6). Exposição a fagos oferece um meio pelo qual é possível gerar bibliotecas de variantes de TCR. Métodos adequados para a exposição de fagos e subsequente rastreamento de bibliotecas de variantes de TCR contendo cada um uma ligação dissulfeto não nativa intercadeias estão descritos em detalhes em (Li *et al.*, (2005) *Nature Biotech* 23 (3): 349-354) e no documento WO 2004/04404.

Deve ser observado que qualquer TCR $\alpha\beta$ que compreende emprego similar do gene V-alfa e V-beta e portanto seqüência de aminoácidos similar àquela do TCR MEL poderia ser um TCR gabarito conveniente. Seria então possível introduzir no DNA codificando uma ou ambas as regi-

ões variáveis do TCR $\alpha\beta$ gabarito as alterações necessárias para produzir os TCRs de alta afinidade alterados da invenção. Como ficará óbvio para os versados na técnica, as mutações necessárias podem ser introduzidas por inúmeros métodos, por exemplo mutagênese direcionada para o sítio.

A menos que de outra forma especificado, as seqüências de aminoácidos de TCR desta invenção geralmente são fornecidas incluindo um resíduo metionina (Met ou M) N-terminal. Como sabem os versados na técnica este resíduo pode ser removido durante a produção de proteínas recombinantes. Como será óbvio para os versados na técnica, pode ser possível truncar as seqüências apresentadas no terminal C e/ou no terminal N do mesmo, por 1, 2, 3, 4, 5 ou mais resíduos, sem afetar significativamente as características de ligação de pMHC do TCR, todas essas variantes triviais estando abrangidas pela presente invenção.

Conforme usado neste relatório o termo "região variável" abrange todos os aminoácidos de um dado TCR que não estão incluídos no domínio constante codificado pelo gene TRAC para as cadeias α do TCR e o TRBC1 ou TRBC2 para as cadeias β do TCR. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc & LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8).

Conforme usado neste relatório o termo "domínio variável" abrange todos os aminoácidos de um dado TCR que estão incluídos na seqüência de aminoácidos codificada por um gene TRAV para as cadeias α do TCR e um gene TRBV para as cadeias β do TCR. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc & LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8).

As modalidades da invenção incluem TCRs alterados que compreendem mutação de um ou mais dos aminoácidos da região variável da cadeia-alfa correspondendo a: 28D, 29R, 30G, 31S, 49M, 51I, 53S, 54N, 72Y, 94V, 95A, 96G, 97K, 98S, e 99T, por exemplo as mutações correspondendo a:

28D?F, 28D?Y, 28D?S, 28D?N,
29R?Q, 29R?L, 29R?I, 29R?F,
30G?H,
31S?A,

49M?I,
 51I?T,
 53S?R,
 54N?E,
 72Y?H,
 94V?D, 94V?P, 94V?S, 94V?L, 94V?N, 95A?G,
 95A?S, 95A?E,
 96G?N, 96G?P, 96G?V, 96G?M, 96G?L, 96G?R,
 97K?R, 97K?Y, 97K?V, 97K?L, 97K?H, 97K?G, 97K?I, 97K?P,
 98S?L, 98S?M, 98S?R,
 99T?L ou 99T?R

A numeração usada acima é a mesma que aquela mostrada na figura 1a e na SEQ ID N° 1

As modalidades da invenção incluem TCRs alterados que compreendem mutação de um ou mais dos aminoácidos da região variável da cadeia-beta correspondendo a: 45L, 51S, 52V, 53G, 54I, 76I, 100G, 101T, 102G, 103E, 104L e 105F, usando a numeração mostrada na SEQ ID N° 2 é/são alterados, por exemplo as mutações correspondendo a:

45L?P,
 51S?Y, 51S?F, 51S?W,
 52V?G,
 53G?P,
 54I?F, 54?Y,
 76I?V,
 100G?N,
 101T?M, 101T?L, 101T?V,
 102G?S, 102G?N, 102G?T,
 103E?G,
 104L?W,
 105F?S, 105F?A, 105F?Q, 105F?D or 105F?E

A numeração usada acima é a mesma que aquela mostrada na figura 1b e na SEQ ID N° 2

Outras modalidades preferidas da invenção são apresentadas por TCRs compreendendo uma das seqüências alteradas de aminoácidos da região variável da cadeia-alfa mostradas na figura 6 (SEQ ID N^o: 11 a 24) ou na figura 20 (SEQ ID N^o: 47 a 53). Variantes fenotipicamente silenciosas de tais TCRs também fazem parte desta invenção.

Outras modalidades preferidas da invenção são apresentadas por TCRs compreendendo uma das seqüências alteradas de aminoácidos da região variável da cadeia-beta mostradas na figura 21 (SEQ ID N^o: 54 a 67). Variantes fenotipicamente silenciosas de tais TCRs também fazem parte desta invenção.

TCRs nativos existem nas formas heterodiméricas $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. No entanto, já foi demonstrado que TCRs recombinantes consistindo nos homodímeros $\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$ se ligam às moléculas MHC de peptídeos. Assim sendo, uma modalidade da invenção é constituída por homodímeros $\alpha\alpha$ de TCR ou homodímeros $\beta\beta$ de TCR.

Outras modalidades preferidas são apresentadas por TCRs da invenção compreendendo a seqüência de aminoácidos da região variável da cadeia-alfa e as combinações de seqüências de aminoácidos da região variável da cadeia-beta listadas abaixo, sendo que variantes fenotipicamente silenciosas de tais TCRs também fazem parte desta invenção:

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID N ^o	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID N ^o
11	2
12	2
13	2
14	2
15	2
16	2
17	2
18	2
19	2

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID Nº	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID Nº
20	2
21	2
22	2
23	2
24	2
47	2
48	2
49	2
50	2
51	2
52	2
53	2
11	54
11	55
11	56
11	57
11	58
11	59
11	60
11	61
11	62
11	63
11	64
11	65
11	66
11	67

Modalidades preferidas fornecem TCRs da invenção compreendendo:

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 2,

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 47 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 2.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 48 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 2.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 53 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 2.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 54.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 55.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 56.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 57.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 58.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 62.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 65.

a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 66.

Ou variantes fenotipicamente silenciosas de qualquer um dos TCRs acima.

Em uma outra modalidade preferida os TCRs da invenção compreendendo as combinações de regiões variáveis detalhadas acima compreendem ainda a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia-alfa mostrada na figura 7a (SEQ ID Nº 25) e uma das seqüências da região constante de aminoácidos da cadeia-beta mostradas nas figuras 7b e 7c (SEQ ID Nºs: 26 e 27) ou variantes fenotipicamente silenciosas dos mesmos.

Conforme usado neste relatório o termo "variantes fenotipicamente silenciosas" refere-se aos TCRs que têm um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor ou igual a 3 μ M. Por exemplo, como sabem os versados na técnica, pode ser possível produzir TCRs que incorporam alterações mínimas em suas regiões constantes e/ou variáveis em relação àqueles descritos em detalhes acima sem alterar a afinidade e/ou a taxa de separação para a interação com o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201. Tais variantes triviais estão incluídas no escopo desta invenção. Os TCRs nos quais foram feitas uma ou mais substituições conservadoras também fazem parte desta invenção.

Em um amplo aspecto, os TCRs da invenção estão na forma de TCRs de cadeia simples (scTCRs) ou de TCRs diméricos (dTCRs) como descrito nos documentos WO 04/033685 e WO 03/020763.

Uma forma adequada de scTCR compreende um primeiro segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma região variável da cadeia α do TCR, um segundo segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma região variável da cadeia do TCR fundida ao terminal N de uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, e uma sequência ligadora ligando o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

Alternativamente o primeiro segmento pode ser constituído por uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma região variável da cadeia β do TCR; o segundo segmento pode ser constituído por uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma sequência da região variável da cadeia α do TCR fundida ao terminal N de uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR.

Os scTCRs acima pode ainda compreender uma ligação dissulfeto entre as primeira e segunda cadeias, a referida ligação dissulfeto sendo uma ligação que não possui equivalente nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos, e onde o comprimento da sequência ligadora e a posição da ligação

dissulfeto são tais que as seqüências do domínio variável dos primeiro e segundo segmentos são mutuamente orientados substancialmente da mesma maneira que nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos.

Mais especificamente o primeiro segmento pode ser constituído por uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia α do TCR fundida ao terminal N de uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, o segundo segmento pode ser constituído por uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma seqüência de aminoácidos correspondendo à seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, e uma ligação dissulfeto pode ser fornecida entre as primeira e segunda cadeias, a referida ligação dissulfeto sendo uma ligação que não possui equivalente nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos.

Nas formas de scTCR acima, a seqüência ligadora pode ligar o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento, e pode ter a fórmula -PGGG-(SGGGG)_n-P- onde n é 5 ou 6 e P é prolina, G é glicina e S é serina.

-PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQ ID Nº 41)

-PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQ ID Nº 42)

Uma forma dTCR adequada dos TCRs da presente invenção compreende

um primeiro polipeptídeo onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e um segundo polipeptídeo onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, o primeiro e o segundo polipeptídios sendo ligados por uma ligação dissulfeto que não possui equivalente nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos.

O primeiro polipeptídeo pode compreender uma seqüência da

região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma sequência correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e um segundo polipeptídio onde uma sequência correspondendo a uma sequência da região variável da cadeia β do TCR é fundida ao terminal N de uma sequência correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, o primeiro e o segundo polipeptídios sendo ligados por uma ligação dissulfeto entre os resíduos cisteína que substituem Thr 48 do exon 1 de TRAC*01 e Ser 57 do exon 1 de TRBC1*01 ou TRBC2*01 ou o equivalente não humano do mesmo. (a nomenclatura "TRAC" neste relatório é aquela do T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc & LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8).

A forma dTCR ou scTCR dos TCRs da invenção pode ter sequências de aminoácidos correspondendo a sequências das regiões constante e variável extracelulares $\alpha\beta$ de TCR humano, e uma ligação dissulfeto pode ligar resíduos de aminoácido das referidas sequências do domínio constante, esta ligação dissulfeto não tendo equivalente nos TCRs nativos. A ligação dissulfeto está entre os resíduos cisteína correspondendo aos resíduos de aminoácidos cujos átomos de carbono β têm menos de 0,6 nm de distância nos TCRs nativos, por exemplo entre os resíduos cisteína que substituem o Thr 48 do exon 1 de TRAC*01 e o Ser 57 do exon 1 de TRBC1*01 ou TRBC2*01 ou o equivalente não humano do mesmo. Outros sítios em que cisteínas podem ser introduzidas para formar a ligação dissulfeto são os seguintes resíduos no exon 1 de TRAC*01 para a cadeia α do TCR e TRBC1*01 ou TRBC2*01 para a cadeia β do TCR:

cadeia α do TCR	cadeia β do TCR	separação do carbono β nativo (nm)
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 17	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

Modalidades específicas da invenção fornecem um TCR da invenção que é um dTCR compreendendo

um primeiro polipeptídio onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e

um segundo polipeptídio onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR,

o primeiro e o segundo polipeptídios sendo ligados por uma ligação dissulfeto que não possui equivalente nas células-T $\alpha\beta$ nativas entre os resíduos cisteína que substituem o Thr 48 do exon 1 de TRAC*01 e Ser 57 do exon 1 de TRBC1*01 ou TRBC2*01 ou o equivalente não humano do mesmo.

Além da ligação dissulfeto não nativa mencionada acima, a forma dTCR ou scTCR dos TCRs da invenção pode incluir uma ligação dissulfeto entre os resíduos que correspondem àqueles ligados por uma ligação dissulfeto nos TCRs nativos.

A forma dTCR ou scTCR dos TCRs da invenção de preferência não contém uma seqüência correspondente a seqüências transmembranas ou citoplasmáticas dos TCRs nativos.

Modalidades geralmente preferidas da invenção fornecem TCRs solúveis compreendendo:

a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 68 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 69 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 70 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 71.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 72.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 73.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 74.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 75.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 76.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 77.

a sequência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a sequência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 78.

Também é fornecido um ácido nucléico ou ácidos nucléicos codificando os TCRs da invenção. Um tal ácido nucléico ou ácidos nucléicos podem ser fornecidos em uma forma que tenha sido adaptada para expressão em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica. Células hospedeiras adequadas incluem, porém sem limitação, células bacterianas, de levedura, de mamíferos ou de insetos. Por exemplo, a célula hospedeira pode ser uma célula T humana ou uma célula-tronco hematopoiética humana.

Um tal ácido nucléico ou ácidos nucléicos adaptados é/são alterados para refletir a preferência do códon da célula hospedeira na qual ele é introduzido. As mutações introduzidas são mutações silenciosas que não afetam a sequência de aminoácidos do polipeptídio ou polipeptídios codificados dessa maneira. GeneArt (Regensburg, Alemanha) oferece um serviço de otimização de ácidos nucléicos adequados (GeneOptimizer®). O documento WO 2004/059556, de propriedade da GeneArt, fornece outros detalhes do processo de otimização.

Outras modalidades geralmente preferidas da invenção são oferecidas por ácidos nucléicos consistindo nas sequências de DNA da cadeia α do TCR de comprimento integral de SEQ ID Nºs 33, 35 ou 37 (figuras 12a,

13a, ou 14a, respectivamente) e na seqüência de DNA da cadeia β do TCR de SEQ ID Nº 39 (mostrada na figura 15a). Uma complementaridade de ácido nucléico para qualquer um dos mencionados acima, ou uma seqüência de RNA correspondente também fazem parte desta invenção. Além disso, como ficará óbvio para os versados na técnica tal ácido nucléico ou ácidos nucléicos codificando os TCRs da invenção também podem compreender seqüências não-codificadoras (íntron).

As seqüências de DNA da cadeia de TCR MEL do tipo selvagem de comprimento integral e alta afinidade de SEQ ID Nºs: 31, 33, 35, 37 e 39 codificam as seqüências de aminoácidos de SEQ ID Nºs: 32, 34, 36, 38, e 40 respectivamente. (Figuras 11b, 12b, 13b, 14b e 15b respectivamente).

As seqüências de aminoácidos de SEQ ID Nºs: 33, 35 e 37 compreendem as regiões variáveis da cadeia-alfa do TCR MEL de alta afinidade de SEQ ID Nºs: 11, 15 e 23 respectivamente.

Como ficará óbvio para os versados na técnica tais seqüências de DNA de cadeia de TCR de comprimento integral codificam as seguintes seqüências:

Uma seqüência-líder e as seqüências extracelular, transmembranosa, e citoplasmática do TCR.

As seqüências de DNA de comprimento integral fornecidas nesta invenção também incluem seqüências de reconhecimento de enzimas de restrição para facilitar a ligação no vetor de escolha.

Monômeros de TCR PEGuilados

Em uma modalidade particular um TCR da invenção é associado a pelo menos uma cadeia polialquileno glicol. Esta associação pode ser feita de várias maneiras conhecidas pelos versados na técnica. Em uma modalidade preferida as cadeias polialquileno são covalentemente ligadas ao TCR. Em uma outra modalidade as cadeias polietileno glicol do presente aspecto da invenção compreendem pelo menos duas unidades repetitivas polietileno.

Complexos de TCR multivalentes

Um aspecto da invenção fornece um complexo de TCR multiva-

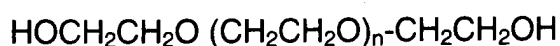
lente compreendendo pelo menos dois TCRs da invenção. Em uma modalidade deste aspecto, pelo menos duas moléculas de TCR são ligadas por meio de porções ligadoras para formar complexos multivalentes. De preferência os complexos são solúveis em água, de modo que a porção ligadora deve ser selecionada de acordo. Além disso, é preferível que a porção ligadora seja capaz de se prender a posições definidas nas moléculas de TCR, para que seja minimizada a diversidade estrutural dos complexos formados. Uma modalidade do presente aspecto é fornecida por um complexo de TCR da invenção onde a cadeia polimérica ou seqüência ligadora peptídica se estende entre resíduos de aminoácido de cada TCR que não estão localizados em uma seqüência da região variável do TCR.

Como os complexos da invenção podem ser usados em medicina, as porções ligadoras devem ser escolhidos tendo em vista sua adequabilidade farmacêutica, por exemplo sua imunogenicidade.

Exemplos de porções ligadoras que preenchem os critérios desejáveis acima são conhecidos na literatura, por exemplo na literatura de fragmentos de anticorpos fixadores.

Existem duas classes de ligador que são preferidas para uso na produção de moléculas de TCR multivalentes da presente invenção. Um complexo de TCR da invenção no qual os TCRs são ligados por uma cadeia polialquilenoglicol constitui uma modalidade do presente aspecto.

A primeira é polímeros hidrofílicos tais como polialquilenoglicóis. Os mais comumente usados desta classe são à base de polietilenglicol ou PEG, cuja estrutura está mostrada abaixo.



onde n é maior que dois. No entanto, outros são à base de outros polialquilenoglicóis opcionalmente substituídos adequados incluem polipropilenglicol, e copolímeros de etilenglicol e propilenglicol.

Tais polímeros podem ser usados para tratar ou conjugar agentes terapêuticos, particularmente agentes terapêuticos à base de polipeptídios ou proteínas, para conseguir alterações benéficas para o perfil farmacocinético do agente terapêutico, por exemplo depuração renal reduzida,

meia-vida aumentada no plasma, imunogenicidade reduzida, e solubilidade aumentada. Acredita-se que tais aperfeiçoamentos no perfil farmacocinético do conjugado PEG-agente terapêutico resultem da molécula ou moléculas de PEG formando um 'envoltório' em torno do agente terapêutico que bloqueia estericamente a reação com o sistema imunológico e reduz a degradação proteolítica. (Casey *et al.*, (2000) *Tumor Targeting* 4 235-244). O tamanho do polímero hidrofílico usando pode ser em particular selecionado com base no uso terapêutico desejado do complexo de TCR. Assim sendo, por exemplo, onde o produto destina-se a deixar a circular e penetrar no tecido, por exemplo para uso no tratamento de um tumor, pode ser vantajoso usar polímeros de baixo peso molecular da ordem de 5 kDa. Existem numerosos artigos de revisão e livros que descrevem detalhadamente o uso de PEG e moléculas similares em formulações farmacêuticas. Por exemplo, vide Harris (1992) *Polyethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum, New York, NY. ou Harris & Zalipsky (1997) *Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol* ACS Books, Washington, D.C.

O polímero usado pode ter uma conformação linear ou ramificada. Moléculas de PEG ramificado, ou derivados das mesmas, podem ser induzidas pela adição de porções ramificadoras que incluem glicerol e oligômeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol e lisina.

Geralmente, o polímero vai ter um grupo ou grupos quimicamente reativos em sua estrutura, por exemplo em um ou ambos os terminais, e/ou em ramificações do esqueleto, para permitir que o polímero se ligue a sítios alvo no TCR. Este grupo ou grupos quimicamente reativos podem ser ligados diretamente ao polímero hidrofílico, ou podem ter um grupo/porção espaçadora entre o polímero hidrofílico e a química reativa como mostrado abaixo:

Química reativa-Polímero hidrofílico-Química reativa

Química reativa-Espaçador-Polímero hidrofílico-Spacer-Química reativa

O espaçador usado na formação de construções do tipo descrito

acima pode ser qualquer porção orgânica que seja uma cadeia não reativa quimicamente estável. Tais espaçadores incluem, porém sem limitação, os seguintes:



Um complexo de TCR da invenção no qual um radical espaçador alquilenos divalente está localizado entre a cadeia polialquilenos glicol e seu ponto de ligação a um TCR do complexo constitui uma outra modalidade do presente aspecto.

Um complexo de TCR da invenção no qual a cadeia polialquilenos glicol compreende pelo menos duas unidades repetitivas polietileno glicol constitui uma outra modalidade do presente aspecto.

Existem numerosos fornecedores comerciais de polímeros hidrofílicos ligados, diretamente ou via um espaçador, a químicas reativas que podem ser úteis na presente invenção. Esses fornecedores incluem Nektar Therapeutics (CA, EUA), NOF Corporation (Japão), Sunbio (Coréia do Sul) e Enzon Pharmaceuticals (NJ, EUA).

Polímeros hidrofílicos comercialmente disponíveis ligados, diretamente ou via um espaçador, a químicas reativas que podem ser úteis na presente invenção incluem, porém sem limitação, os seguintes:

Descrição do ligador PEG	Origem do PEG	Catálogo Número
ligação de monômero de TCR		
5K linear (Maleimida)	Nektar	2D2MOHO1
20K linear (Maleimida)	Nektar	2D2MOPO1
20K linear (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20K ramificado (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL2-200MA
30K linear (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
40K PEG ramificado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTO1
5K-NP linear (para ligação de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10K-NP linear (para ligação de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20K-NP linear (para ligação de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T

Descrição do ligador PEG	Origem do PEG	Catálogo Número
ligadores de dímero de TCR		
3,4K linear (Maleimida)	Nektar	2D2DOFO2
5K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOHOF
10K linear (com ligadores ortopiridil ds no lugar de maleimida)	Sunbio	
20K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOPOF
20K linear (Maleimida)	NOF Corporation	
40K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTOF
Multímeros de TCR de ordem superior		
15K, 3 braços, Mal ₃ (para trímero)	Nektar	OJOONO3
20K, 4 braços, Mal ₄ (para tetrâmero)	Nektar	OJOOP04
40 K, 8 braços, Mal ₈ (para octâmero)	Nektar	OJOOTO8

Uma grande variedade de químicas de acoplamento pode ser usada para acoplar moléculas de polímeros a agentes terapêuticos à base de proteínas e peptídios. A escolha da química de acoplamento mais apropriada depende bastante do sítio de acoplamento desejado. Por exemplo, as químicas de acoplamento a seguir foram usadas associadas a um ou mais dos terminais de moléculas de PEG (Fonte: Nektar Molecular Engineering Catalogue 2003):

N-maleimida

Vinil sulfona

Carbonato de benzotriazola

Propionato de succinimidila

Butanoato de succinimidil

Tio-éster

Acetaldeídos

Acrilatos

Biotina

Aminas primárias

Como mencionado acima polímeros não à base de PEF também

oferecem ligadores adequados para a multimerização dos TCRs da presente invenção. Por exemplo, podem ser usadas porções contendo terminais maleimida ligados por cadeias alifáticas tais como BMH e BMOE (Pierce, produtos N^{os} 22330 e 22323).

Ligadores peptídicos constituem a outra classe de ligadores de TCR. Estes ligadores são compreendidos de cadeias de aminoácidos, e funcionam para produzir ligadores simples ou domínios de multimerização aos quais moléculas de TCR podem ser presas. O sistema biotina / estreptavidina foi anteriormente usado para produzir tetrâmeros de TCR (vide o documento WO/99/60119) para estudos de ligação *in vitro*. No entanto, a estreptavidina é um polipeptídeo derivado de micróbios e como tal não é exatamente adequado para uso em um agente terapêutico.

Um complexo de TCR da invenção no qual os TCRs são ligados por um ligador peptídico derivado de um domínio de multimerização humano constitui uma outra modalidade do presente aspecto.

Existem numerosas proteínas humanas que contêm um domínio de multimerização que poderia ser usado na produção de complexos multivalentes de TCR. Por exemplo o domínio de tetramerização de p53 que foi utilizado para produzir tetrâmeros de fragmentos do anticorpo scFv que apresentaram maior persistência no soro e taxa de separação significativamente reduzida em relação ao fragmento monomérico de scFv. (Willuda *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276** (17): 14385-14392). A hemoglobina também tem um domínio de tetramerização que poderia ser potencialmente usado para este tipo de aplicação.

Um complexo multivalente de TCR da invenção compreendendo pelo menos dois TCRs constitui uma modalidade final deste aspecto, onde pelo menos um dos referidos TCRs é associado a um agente terapêutico.

Em um aspecto um TCR (ou complexo multivalente do mesmo) da presente invenção pode alternativamente ou adicionalmente compreender uma cisteína reativa no terminal C ou no terminal N de suas cadeias alfa ou beta.

Uso diagnóstico e terapêutico

Em um aspecto o TCR da invenção pode ser associado a um agente terapêutico ou a uma porção detectável. Por exemplo, o referido agente terapêutico ou porção detectável pode ser covalentemente ligado ao TCR.

Em uma modalidade da invenção o referido agente terapêutico ou porção detectável é covalentemente ligado ao terminal C de uma ou de ambas as cadeias do TCR.

Em um aspecto o scTCR ou uma ou ambas as cadeias dTCR dos TCRs da presente invenção podem ser marcados com uma porção detectável, por exemplo um marcador que seja adequado para fins de diagnóstico. Tais TCRs marcados são úteis em um método para detectar um complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201, método este que compreende contatar o ligando de TCR com um TCR (ou uma complexo multimérico de TCR de alta afinidade) que é específico para o ligando de TCR; e para detectar a ligação ao ligando de TCR. Em complexos tetraméricos de TCR formados por exemplo, usando heterodímeros biotinilados, pode-se usar estreptavidina fluorescente para proporcionar um marcador detectável. Tal tetrâmero de TCR marcado com fluorescência é adequado para uso em análise por FACS, por exemplo para detectar células apresentando antígeno contendo o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 para o qual estes TCRs de alta afinidade são específicos.

Uma outra maneira pela qual é possível detectar os TCRs solúveis da presente invenção é pelo uso de anticorpos específicos para TCR, em particular anticorpos monoclonais. Existem muitos anticorpos anti-TCR comercialmente disponíveis, tais como α FI e β FI, que reconhecem os domínios constantes das cadeias α e β , respectivamente.

Em um outro aspecto um TCR (ou complexo multivalente do mesmo) da presente invenção pode alternativamente ou adicionalmente ser associado (por exemplo covalentemente ligado ou de outra forma ligado) a um agente terapêutico que pode ser, por exemplo, uma porção tóxica para uso no extermínio de células, ou uma molécula efetora imune tal como uma

interleucina ou uma citocina. Um complexo multivalente de TCR da invenção pode ter capacidade de ligação aumentada para um ligando de TCR em relação a um receptor de células-T do tipo selvagem não-multimérico ou um heterodímero do receptor de células-T da invenção. Por conseguinte, os complexos multivalentes de TCR de acordo com a invenção são particularmente úteis para rastrear ou atacar células que apresentam antígenos particulares *in vitro* ou *in vivo*, e também são úteis como intermediários para a produção de outros complexos multivalentes de TCR tendo tais empregos. Estes TCRs ou complexos multivalentes de TCR podem ser portanto ser fornecidos em uma formulação farmacêuticamente aceitável para uso *in vivo*.

A invenção também fornece um método para distribuir um agente terapêutico para uma célula-alvo, método este que compreende contatar células-alvo potenciais com um TCR ou um complexo multivalente de TCR de acordo com a invenção em condições que permitam prender o TCR ou complexo multivalente de TCR à célula-alvo, o referido TCR ou complexo multivalente de TCR sendo específico para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 e tendo um agente terapêutico associado ao mesmo.

Em particular, o TCR solúvel ou complexo multivalente de TCR da presente invenção pode ser usado para distribuir agentes terapêuticos para o local de células apresentando um antígeno particular. Isto é útil em muitas situações e, em particular, contra tumores. É possível distribuir um agente terapêutico que exerça seu efeito no local mas não apenas na célula à qual ele se liga. Portanto, uma estratégia particular considera moléculas antitumorais ligadas a TCRs ou a complexos multivalentes de TCR de acordo com a invenção específicas para antígenos contra tumores.

Muitos agentes terapêuticos podem ser empregados com esta finalidade, por exemplo compostos radioativos, enzimas (perforina por exemplo) ou agentes quimioterápicos (cisplastina por exemplo). Para garantir que efeitos tóxicos sejam exercidos no local desejado a toxina pode estar no interior de um lipossoma ligado à estreptavidina para que o composto seja liberado lentamente. Isto vai impedir efeitos nocivos durante o transporte no

corpo e garantir que a toxina tenha efeito máximo depois da ligação do TCR às células apresentando o antígeno relevante.

Outros agentes terapêuticos adequados incluem:

- agentes citotóxicos de moléculas pequenas, isto é, compostos com capacidade de eliminar células mamíferas com peso molecular menor que 700 daltons. Tais compostos também podem conter metais tóxicos capazes de ter efeito citotóxico. Além disso, deve ficar entendido que estes agentes citotóxicos de moléculas pequenas também incluem pró-fármacos, isto é, compostos que se decompõem ou são convertidos em condições fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Exemplos desses agentes incluem cisplatina, derivados de maitansina, rachelmycin, caliqueamicina, docetaxel, etoposida, gencitabina, ifosfamida, irinotecano, melfalano, mitoxantrona, "sorfimer sodiumphotofrin II", temozolmida, topotecano, glicuronato de trime-treato, auristatina E vincristina e doxorubicina;

- citotoxinas peptídicas, isto é, proteínas ou fragmentos das mesmas com capacidade para eliminar células mamíferas. Incluindo, porém sem limitação, ricina, toxina diftérica, exotoxina A da bactéria pseudomonas, DNAase e RNAase;

- radionuclídeos, isto é, isótopos instáveis de elementos que se decompõem com a emissão simultânea de uma ou mais das partículas α ou β , ou raios γ , incluindo, porém sem limitação, iodo 131, rênio 186, índio 111, ítrio 90, bismuto 210 e 213, actínio 225 e astatina 213; agentes quelantes podem ser usados para facilitar a associação destes radionuclídeos aos TCRs de alta afinidade, ou multímeros dos mesmos;

- pró-fármacos, incluindo, porém sem limitação, pró-fármacos enzimáticos direcionados para anticorpos;

- imunoestimulantes, isto é, porções que estimulam uma resposta imunológica. Incluindo, porém sem limitação, citocinas tais como IL-2 e IFN, superantígenos e mutantes dos mesmos, complexos de pHLA e quimiocinas tais como IL-8, fator plaquetário 4, proteína estimuladora do crescimento de melanoma etc., anticorpos ou fragmentos da mesma, ativadores de complemento, domínios de proteínas xenogênicas, domínios de proteí-

nas alogênicas, domínios de proteínas virais/bacterianas, peptídeos virais/bacterianos e anticorpos determinantes anti-células-T (por exemplo anti-CD3 ou anti-CD28).

Fragmentos e variantes de anticorpos funcionais

Fragmentos e variantes/análogos de anticorpos que são adequados para uso nas composições e métodos descritos neste relatório incluem, porém sem limitação, os seguintes.

Fragmentos de anticorpos

Como sabem os versados na técnica, é possível produzir fragmentos de um dado anticorpo que retêm substancialmente as mesmas características de ligação que aquelas do anticorpo primitivo. A descrição a seguir oferece detalhes de tais fragmentos:

Minicorpos – Estas construções consistem em anticorpos com uma porção Fc truncada. Como tais eles retêm os domínios de ligação completos do anticorpo do qual derivam.

Fragmentos Fab – Estes compreendem uma única cadeia leve de imunoglobulina covalentemente ligada à parte de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Como tais, os fragmentos Fab compreendem um único sítio de combinação de antígeno. Os fragmentos Fab são definidos pela porção de uma IgG que pode ser liberada por tratamento com papaína. Estes fragmentos normalmente são produzidos por técnicas de DNA recombinante. (Reeves *et al.*, (2000) *Lecture Notes on Immunology* (4th Edition) Publicado por Blackwell Science).

Fragmentos F(ab')₂ – Estes compreendem os dois sítios de combinação de antígeno e a região da dobradiça de um único anticorpo. Os fragmentos F(ab')₂ são definidos pela porção de uma IgG que pode ser liberada por tratamento com pepsina. Estes fragmentos normalmente são produzidos por técnicas de DNA recombinante. (Reeves *et al.*, (2000) *Lecture Notes on Immunology* (4th Edition) Publicado por Blackwell Science).

Fragmentos Fv – Estes compreendem um domínio pesado variável de imunoglobulina ligado a um domínio leve variável de imunoglobulina. Já foram produzidos diversos modelos de Fv. Estes incluem dsFvs, nos

quais a associação entre os dois domínios é intensificada por uma ligação dissulfeto introduzida. Alternativamente, é possível formar scFvs usando um ligador peptídico para ligar os dois domínios como um único polipeptídeo. Construções de Fvs contendo um domínio variável de uma cadeia pesada ou leve de imunoglobulina associada ao domínio variável e constante da cadeia pesada ou leve de imunoglobulina correspondente também já foram produzidas. Fvs também já foram multimerizados para formar diacorpos e triacorpos (Maynard et al., (2000) *Annu Rev Biomed Eng* 2 339-376)

Nanobodies™ – Estas construções, comercializadas por Ablynx (Bélgica), compreendem um único domínio pesado variável de imunoglobulina sintética derivado de um anticorpo de um camelídeo (por exemplo camelo ou lhama).

Anticorpos de domínio - Estas construções, comercializadas por Domantis (Bélgica), compreendem um único domínio pesado variável de imunoglobulina maturada por afinidade ou um domínio leve variável de imunoglobulina.

Variantes e análogos de anticorpos

A característica funcional de definição de anticorpos no contexto da presente invenção é sua capacidade de se ligar especificamente a um ligando alvo. Como sabem os versados na técnica é possível construir essas características de ligação em uma gama de outras proteínas. Exemplos de variantes e análogos de anticorpos adequados para uso nas composições e métodos da presente invenção incluem, porém sem limitação, os seguintes.

Polipeptídios fixadores à base de cadafalso de proteína ("protein scaffold-based binding polypeptides") – Esta família de construções fixadoras compreende análogos alterados de proteínas que contêm alças fixadoras nativas. Exemplos incluem Affibodies, comercializados por Affibody (Suécia), que se baseiam em um motivo de três hélices derivado de um dos domínios fixadores de IgG da proteína A de *Staphylococcus aureus*. Um outro exemplo inclui Evibodies, comercializados por EvoGenix (Austrália) que se baseiam nos domínios extracelulares de CTLA-4 nos quais são enxertados domínios semelhantes a alças fixadoras de anticorpos. Um exemplo

final, Cytokine Traps comercializados por Regeneron Pharmaceuticals (US), enxertam domínios receptores de citocinas em cadafalsos de anticorpos ("antibody scaffolds"). (Nygren *et al.*, (2000) *Current Opinion in Structural biology* 7:463-469) oferece uma revisão dos usos de cadafalsos para construir novos sítios de ligação em proteínas. Esta revisão menciona as seguintes proteínas como fontes de cadafalsos: dedo de zinco CP1, Tendamistat, domínio Z (um análogo da proteína A), PST1, espirais enroladas ("Coiled coils"), LACI-D1 e citocroma b₅₆₂. Outros estudos de cadafalsos de proteínas relataram o uso de fibronectina, proteína fluorescente verde (GFP) e repetições de anquirina.

Como sabem os versados na técnica é possível produzir anticorpos ou fragmentos, variantes ou análogos dos mesmos que se ligam a várias partes do ligando de uma dada proteína. Por exemplo, anticorpos anti-CD3 podem ser produzidos para qualquer das cadeias polipeptídicas das quais este complexo é formado (isto é, cadeias γ , δ , ϵ , ζ , e η de CD3). Os anticorpos que se ligam à cadeia ϵ de CD3 são os anticorpos anti-CD3 preferidos para uso nas composições e métodos da presente invenção.

Os TCRs solúveis ou complexos multivalentes de TCR da presente invenção podem ser ligados a uma enzima capaz de converter um pró-fármaco em um fármaco. Isto permite que o pró-fármaco seja convertido no fármaco somente no local em que ele é necessário (isto é, vetorizada pelos sTCR).

Acredita-se que os TCRs específicos para AAGIGILTV (SEQ ID Nº 43)-HLA-A*0201 de alta afinidade apresentados nesta invenção possam ser usados em métodos para diagnóstico e tratamento de câncer.

Para tratamento de câncer, a localização na vizinhança de tumores ou metástase aumentaria o efeito das toxinas ou imunoestimulantes. Para distribuição de vacina, o antígeno da vacina poderia ser localizado na vizinhança de células apresentando antígeno, dessa forma aumentando a eficácia do antígeno. O método pode ser aplicado com a finalidade de fazer imagens.

Uma modalidade é constituída por uma célula isolada apresen-

tando um TCR da invenção. Por exemplo, a referida célula pode ser uma célula T humana ou uma célula-tronco hematopoiética humana.

Outras modalidades da invenção são constituídas por uma composição farmacêutica compreendendo:

um TCR ou um complexo multivalente de TCR da invenção (opcionalmente associado a um agente terapêutico), ou uma pluralidade de células apresentando pelo menos um TCR da invenção, ou um ácido nucléico ou ácidos nucléicos codificando um TCR da invenção junto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

A invenção também fornece um método de tratamento de câncer compreendendo administrar a um indivíduo sofrendo de tal doença cancerosa uma quantidade eficaz de um TCR ou de um complexo multivalente de TCR da invenção (opcionalmente associado a um agente terapêutico), ou de uma pluralidade de células apresentando pelo menos um TCR da invenção, ou de um ácido nucléico ou ácidos nucléicos codificando um TCR da invenção. Em uma modalidade relacionada a invenção fornece o uso de um TCR ou de um complexo multivalente de TCR da invenção (opcionalmente associado a um agente terapêutico), ou de uma pluralidade de células apresentando pelo menos um TCR da invenção na preparação de uma composição para o tratamento de câncer.

Como ficará óbvio para os versados na técnica, os cânceres que são passíveis de tratamento por composições compreendendo os TCRs da invenção serão cânceres Melano-A⁺.

TCRs terapêuticos ou para imagem de acordo com a invenção geralmente serão fornecidos como parte de uma composição farmacêutica estéril que normalmente vai incluir um veículo farmaceuticamente aceitável. Esta composição farmacêutica pode estar em qualquer forma adequada (dependendo do método desejado para administrá-la ao paciente). Ela pode ser fornecida em forma de dosagem unitária, geralmente será fornecida em um recipiente vedado e pode ser fornecida como parte de um kit. Tal kit normalmente (embora não necessariamente) incluirá instruções de uso. Ele pode incluir uma pluralidade das referidas formas de dosagem unitária.

A composição farmacêutica pode ser adaptada para administração por qualquer via apropriada, por exemplo, por via parenteral, transdérmica ou por inalação, de preferência por via parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular ou, mais preferivelmente, intravenosa). Estas composições podem ser preparadas por qualquer método conhecido na literatura de farmácia, por exemplo por mistura do composto ativo com o(s) veículo(s) ou excipiente(s) em condições estéreis.

As dosagens das substâncias da presente invenção podem variar entre amplos limites, dependendo da doença ou distúrbio a ser tratado, da doença e da condição do indivíduo a ser tratado etc., e o médico vai essencialmente determinar as dosagens apropriadas a serem usadas.

Aspectos adicionais

Um scTCR ou dTCR (que de preferência é constituído por seqüências constantes e variáveis correspondentes a seqüências humanas) da presente invenção pode ser fornecido na forma substancialmente pura, ou como uma preparação purificada ou isolada. Por exemplo, ele pode ser fornecido em uma forma que seja substancialmente livre de outras proteínas.

A invenção também fornece um método para identificar um TCR de alta afinidade com a propriedade de se ligar ao AAGIGILTV-HLA-A*0201 caracterizado pelo fato de o TCR (i) compreender pelo menos um domínio variável da cadeia α do TCR e/ou pelo menos um domínio variável da cadeia β do TCR e (ii) ter um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor que 3 μ M, o referido método compreendendo:

(a) a produção de uma biblioteca variada de TCRs compreendendo os domínios variáveis das cadeias α e β do TCR MEL onde um dos domínios variáveis das cadeias α e β ou ambos compreendem uma mutação (mutações);

(b) contatar a referida biblioteca variada de TCRs com AAGIGILTV-HLA-A*0201 em condições adequadas para permitir a ligação dos TCRs ao AAGIGILTV-HLA-A*0201; e

(c) medir o K_D da interação.

As características preferidas de cada aspecto da invenção são as mesmas que as dos outros aspectos *mutatis mutandis*. Os documentos da técnica anterior mencionados neste relatório estão aqui incorporados na medida do permitido por lei.

Exemplos

A invenção está ainda descrita nos exemplos a seguir, que não limitam o escopo da invenção de forma alguma.

Na descrição a seguir faz-se referência aos desenhos anexos nos quais:

As figuras 1a e 1b mostram as seqüências de aminoácidos da região variável da cadeia-alfa e da região variável da cadeia-beta do TCR MEL nativo respectivamente.

As figuras 2a e 2b mostram respectivamente a seqüência de DNA das versões solúveis das cadeias α e β do TCR MEL nativo.

As figuras 3a e 3b mostram respectivamente as seqüências de aminoácidos extracelulares das cadeias α e β do MEL TCR produzidas a partir das seqüências de DNA das figuras 2a e 2b.

As figuras 4a e 4b mostram respectivamente a seqüência de DNA das versões solúveis das cadeias α e β do TCR MEL alteradas para incluir resíduos cisteína adicionais para formar uma ligação dissulfeto não nativa. O códon alterado em cada cadeia está indicado por sombreamento e os sítios de reconhecimento de enzima de restrição estão sublinhados.

As figuras 5a e 5b mostram respectivamente as seqüências de aminoácidos extracelulares das cadeias α e β do MEL TCR produzidas a partir das seqüências de DNA das figuras 4a e 4b. A cisteína introduzida em cada seqüência está indicada por sombreamento.

A figura 6 mostra as seqüências de aminoácidos da região variável da cadeia-alfa de variantes de TECT MEL de alta afinidade. Os resíduos alterados estão sublinhados.

A figura 7a mostra a seqüência de aminoácidos de uma forma truncada do TRAC.

A figura 7b mostra a seqüência de aminoácidos de uma forma

truncada do TRBC1.

A figura 7c mostra a seqüência de aminoácidos de uma forma truncada do TRBC2.

A figura 8a mostra o mapa de plasmídico do plasmídio pEX202.

A figura 8b mostra a seqüência de DNA do plasmídio pEX202.

A figura 9a mostra em detalhes as seqüências de aminoácidos da cadeia-alfa de uma variante de TCR MEL de alta afinidade, solúvel, preferida.

A figura 9b mostra em detalhes as seqüências de aminoácidos da cadeia-beta do TCR MEL solúvel do tipo selvagem usando a região constante codificada TRBC2 fundida por meio de um ligador peptídico à IL-2 humana do tipo selvagem. As seqüências do ligador e da IL-2 estão em *itálico*.

A figura 10 mostra a curva de resposta Biacore gerada para a interação de um TCR MEL ligado a dissulfeto, solúvel, do tipo selvagem, e HLA-AAGIGILTV-HLA-A*0201

As figuras 11a e 11b mostram a seqüência de DNA da cadeia-alfa do TCR MEL do tipo selvagem e comprimento integral alterada para produzir expressão aumentada em células humanas e a seqüência de aminoácidos assim codificada respectivamente.

As figuras 12a e 12b mostram a seqüência de DNA da cadeia-alfa do TCR MEL c1 do tipo selvagem e comprimento integral alterada para produzir expressão aumentada em células humanas e a seqüência de aminoácidos assim codificada respectivamente.

As figuras 13a e 13b mostram a seqüência de DNA da cadeia-alfa do TCR MEL c1d do tipo selvagem e comprimento integral alterada para produzir expressão aumentada em células humanas e a seqüência de aminoácidos assim codificada respectivamente.

As figuras 14a e 14b mostram a seqüência de DNA da cadeia-alfa do TCR MEL c9 do tipo selvagem e comprimento integral alterada para produzir expressão aumentada em células humanas e a seqüência de aminoácidos assim codificada respectivamente.

As figuras 15a e 15b mostram a seqüência da cadeia-alfa do

TCR MEL c9 de comprimento integral alterada para produzir expressão aumentada em células humanas e a sequência de aminoácidos assim codificada respectivamente.

A figura 16 mostra um ensaio ELISPOT demonstrando a capacidade de uma versão solúvel ligada por dissulfeto do TCR Mel c1 WT de alta afinidade para inibir a ativação de um clone de CTL específico para Mel.

As figuras 17a e 17b mostram as seqüências de DNA codificadoras da ORF da cadeia-alfa do TCR MEL do tipo selvagem e comprimento integral e as seqüências de DNA codificadoras da ORF da cadeia-beta do TCR MEL do tipo selvagem respectivamente.

A figura 18 mostra a seqüência de DNA codificadora da ORF da cadeia alfa do trc MEL c1 de comprimento integral compreendendo códons de DNA do tipo selvagem exceto para aquelas codificando os aminoácidos alterados.

A figura 19a mostra dados de FACS no nível da expressão de TCR obtida por transfecção de células Jurkat com DNA não otimizado com códon codificando um TCR MEL c1 alfa / WT beta.

A figura 19b mostra dados de FACS no nível da expressão de TCR obtida por transfecção de células Jurkat com DNA otimizado com códon codificando um TCR MEL c1 alfa / WT beta.

A figura 20 mostra as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeias alfa adicionais do TCR MEL de alta afinidade. Os resíduos alterados estão sublinhados.

A figura 21 mostra as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeias beta adicionais do TCR MEL de alta afinidade. Os resíduos alterados estão sublinhados.

A figura 22 mostra as seqüências de aminoácidos de cadeias alfa solúveis do TCR MEL de alta afinidade compreendendo um resíduo cisteína não-nativo. O resíduo cisteína não-nativo está iluminado e os resíduos alterados estão sublinhados.

A figura 23 mostra as seqüências de aminoácidos de cadeias beta solúveis do TCR MEL de alta afinidade compreendendo um resíduo

cisteína não-nativo. O resíduo cisteína não-nativo está iluminado e os resíduos alterados estão sublinhados.

Exemplo 1 – Produção de um TCR solúvel e ligado a dissulfeto compreendendo os domínios variáveis MEL nativos

As figuras 4a e 4b mostram as seqüências de DNA das cadeias-alfa e beta solúveis e ligados por dissulfeto do TCR MEL do tipo selvagem que é específico para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201. Estas seqüências de DNA podem ser sintetizadas de novo por várias empresas de pesquisa conveniadas, por exemplo GeneArt (Regensburg, Alemanha). Sítios de reconhecimento de enzimas de restrição também são adicionados a estas seqüências de DNA para facilitar a ligação destas seqüências de na em plasmídios de expressão à base de pGMT7, que contêm o promotor T7 para expressão de alto nível em *E. coli* cepa BL21-DE3(pLysS) (Pan *et al.*, *Biotechniques* (2000) **29** (6): 1234-8).

As seqüências de DNA codificando cada cadeia TCR cortada com *NdeI* e *HindIII* são ligadas em vetores pEX202 à base de pGMT7 e separados, que também são cortados com *NdeI* e *HindIII*. (Vide figura 8a para o mapa plasmídico de pEX202, e figura 8b para a seqüência de DNA deste vetor (SEQ ID Nº 28)).

Sítios de reconhecimento de enzimas de restrição introduzidos em DNA codificando as cadeias do TCR MEL do tipo selvagem e solúvel:

NdeI - CATATG

HindIII - AAGCTT

Ligação

Plasmídios ligados são transformados em células competentes de *E. coli* cepa XL1-blue e plaqueados em placas de LB/água contendo 100 mg/ml de ampicilina. Depois de incubar por uma noite a 37°C, colônias individuais são recolhidas e cultivadas em 10 ml de LB contendo 100 mg/ml de ampicilina por uma noite a 37°C com agitação. Plasmídios clonados são purificados usando um kit Miniprep (Qiagen) e o enxerto é sequenciado usando um sequenciador de DNA automático (Lark Technologies).

As figuras 5a e 5b mostram respectivamente as seqüências de

aminoácidos extracelulares das cadeias α e β do MEL TCR do tipo selvagem e ligado a dissulfeto produzidas a partir das seqüências de DNA das figuras 4a e 4b. As seqüências de reconhecimento de enzimas de restrição nestas seqüências de DNA estão sublinhadas.

Exemplo 2- Produção de variantes de alta afinidade do TCR MEL solúvel e ligado a dissulfeto

O TCR MEL nativo solúvel e ligado a dissulfeto produzido da maneira descrita no exemplo 1 pode ser usado como um gabarito a partir do qual se pode produzir os TCRs da invenção que possuem uma afinidade aumentada para o complexo AAGIGILTV (SEQ ID N° 43) -HLA-A*0201.

Exposição a fagos oferece um meio pelo qual é possível gerar bibliotecas de variantes de TCR Gag de HIV. Por exemplo, os métodos adequados para a exposição a fagos e rastreamento de TCR descritos em detalhes em (Li *et al.*, (2005) *Nature Biotech* **23** (3): 349-354) podem ser adaptados e aplicados a TCRs Gag de HIV.

As seqüências de aminoácidos das regiões variáveis alfa do TCR alterado que, quando combinadas com a região variável beta de MEL do tipo selvagem, demonstram alta afinidade para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 estão listadas na figura 6. (SEQ ID N°s: 11-24). Como sabem os versados na técnica as alterações de códon necessárias requeridas para produzir estas cadeias alteradas podem ser introduzidas no DNA codificando estas cadeias por mutagênese direcionada para o sítio. (Kit de mutagênese direcionada para o sítio QuickChange™ da Stratagene).

Em resumo, isto é obtido usando iniciadores que incorporam as alterações de códon desejados e os plasmídios pEX202 contendo o DNA da cadeia do TCR MEL relevante como gabarito para a mutagênese.

A mutagênese é realizada usando as seguintes condições: 50 ng do plasmídio gabarito, 1 μ l de dNTP 10 mM, 5 μ l de tampão Pfu DNA polimerase 10x como fornecido pelo fabricante, 25 pmol de iniciador normal ("fwd primer"), 25 pmol de iniciador invertido ("rev primer"), 1 μ l de pfu DNA polimerase num volume total de 50 μ l. Depois de uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, a reação é submetida a 25 ciclos de desna-

turação (95°C, 10 segundos), combinação (55°C, 10 segundos), e alongamento (72°C, 8 minutos). O produto resultante é digerido com a enzima de restrição DpnI para remover o plasmídio gabarito e transformado em *E. coli* cepa XL1-blue. A mutagênese foi verificada por sequenciamento.

Exemplo 3 – Expressão, redobradura e purificação de TCR solúvel

Os plasmídios de expressão pEX202 contendo as cadeias α do TCR MEL e as cadeias β do TCR MEL preparadas nos exemplos 1 ou 2 são separadamente transformadas em *E. coli* cepa BL21pLysS, e colônias individuais resistentes à ampicilina são cultivadas a 37°C no meio TYP (ampicilina 100 μ g/ml) até OD₆₀₀ de 0,4 antes da indução de expressão de proteína com IPTG 0,5 mM. As células são recolhidas três horas pós-indução por centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm em uma centrífuga Beckman J-6B. Os péletes de células são ressuspensos em um tampão contendo Tris-HCl 50 mM, sacarose a 25% (p/v), NaEDTA 1 mM, NaAzida a 0,1% (p/v), DTT 10 mM, pH 8,0. Depois de uma etapa de congelamento-descongelamento por uma noite, as células ressuspensas são sonicadas em explosões de 1 minuto por um total de cerca de 10 minutos em um sonicador Milsonix XL2020 usando uma sonda padrão de 12 mm de diâmetro. Péletes de corpos de inclusão são recuperados por centrifugação por 30 minutos a 13000 rpm em uma centrífuga Beckman J2-21. São então realizadas três lavagens com detergente para remover fragmentos de células e componentes membranosos. Cada vez a pélete de corpos de inclusão é homogeneizada em um tampão Triton (Tris-HCl 50 mM, Triton-X100 a 0,5%, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM, NaAzida a 0,1% (p/v), DTT 2 mM, pH 8,0) antes de ser peletizada por centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm em uma centrífuga Beckman J2-21. O detergente e o sal são então removidos por uma lavagem semelhante no seguinte tampão: Tris-HCl 50 mM, NaEDTA 1 mM, NaAzida a 0,1% (p/v), DTT 2mM, pH 8,0. Por fim, os corpos de inclusão foram divididos em alíquotas de 30 mg e congelados a -70°C. O rendimento de proteínas dos corpos de inclusão é quantificado por solubilização com guanidina-HCl 6 M e medição com um ensaio de ligação a corante Bradford (PerBio).

Aproximadamente 30 mg de corpos de inclusão solubilizados da cadeia β do TCR e 60 mg de corpos de inclusão solubilizados da provenientes de estoques congelados foram descongelados, e as amostras foram então misturadas e a mistura foi diluída em 15 ml de uma solução de guanidina (cloridrato de guanidina 6 M, acetato de sódio 10 mM, EDTA 10 mM), para garantir a desnaturação completa das cadeias. A solução de guanidina contendo cadeias de TCR desnaturadas e completamente reduzidas é então injetada em 1 litro do seguinte tampão de redobradura: Tris 100 mM pH 8,5, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutathione reduzida 5 mM, glutathione oxidada 0,5 mM, uréia 5 M, PMSF 0,2 mM. O par de redox (2-mercaptoetilamina e cistamina (até concentrações finais de 6,6 mM e 3,7 mM, respectivamente) é adicionado aproximadamente 5 minutos antes da adição das cadeias desnaturadas de TCR. A solução é deixada de lado por 5 horas $\pm$ 15 minutos. O TCR redobrado é dialisado na membrana Spectrapor 1 (Spectrum; Produto N° 132670) contra 10 l de Tris 10 mM pH 8,1 a 5°C $\pm$ 3°C por 18-20 horas. Depois deste período, o tampão de diálise é trocado por Tris 10 mM fresco pH 8,1 (10 l) e a diálise continua a 5°C $\pm$ 3°C por mais 20 - 22 horas.

sTCR é separado dos produtos de degradação e das impurezas carregando o TCR redobrado dialisado em uma coluna de troca aniônica POROS 50HQ e eluindo a proteína ligada com um gradiente de NaCl de 0 - 500 mM em 50 volumes de coluna usando um purificador Akta (Pharmacia). As frações de pico são armazenadas a 4°C e analisadas por SDS-PAGE colorido com Coomassie antes de serem reunidas e concentradas. Por fim, o sTCR é purificado e caracterizado usando uma coluna de filtração de gel Superdex 200HR previamente equilibrada no tampão HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,5 mM, nonidet p40 a 0,05%). O pico eluindo a um peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa é reunido e concentrado antes de ser caracterizado por análise por ressonância de plasmônio de superfície BIAcore.

Exemplo 4 – Caracterização por ressonância de plasmônio de superfície Biacore da ligação de sTCR a pMHC específico

Um biossensor de ressonância de plasmônio de superfície da

(Biacore 3000[®]) foi usado para analisar a ligação de TCRs MEL solúveis ao ligando peptídeo-MHC cognato. Isto foi facilitado pela produção de complexos de pMHC individuais (descritos abaixo) que foram imobilizados em uma superfície de ligação revestida com estreptavidina em de forma semi-orientada, possibilitando verificar de forma eficiente a ligação de um receptor de células-T solúvel a até quatro pMHC diferentes (imobilizados em células de fluxo separadas) simultaneamente. A injeção manual do complexo de HLA permite que o nível preciso de moléculas classe I imobilizadas seja facilmente manipulado.

Moléculas HLA-A*0201 classe I biotiniladas foram redobradas *in vitro* de corpos de inclusão expressos em bactérias contendo as proteínas de subunidades constituintes e peptídeo sintético, seguido de purificação e biotinilação enzimática *in vitro* (O'Callaghan *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* **266**: 9-15). A cadeia pesada HLA-A*0201 foi expressa com um traçador de biotinilação de terminal C que substitui os domínios transmembranosos e citoplasmáticos da proteína em uma construção apropriada. Foram obtidos níveis de expressão de corpos de inclusão de ~75 mg/litro de cultura bacteriana. A cadeia leve MHC ou β 2-microglobulina também foi expressa como corpos de inclusão em *E. coli* a partir de uma construção apropriada, em um nível de ~500 mg/litro de cultura bacteriana.

Células de *E. coli* foram lisadas e os corpos de inclusão foram purificados até uma pureza de aproximadamente 80%. A proteína dos corpos de inclusão foi desnaturada em guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, e foi redobrada a uma concentração de 30 mg/litro de cadeia pesada, 30 mg/litro de β 2m em L-arginina-HCl 0,5 M, Tris 100 mM pH 8,1, cistamina 3,7 mM, β -cisteamina 6,6 mM, 4 mg/ml do peptídeo AAGIGILTV que a molécula HLA-A*0201 requer que seja carregado, por adição de um único pulso de proteína desnaturada no tampão de redobradura a < 5°C. A redobradura foi deixada chegar ao fim a 4°C por pelo menos 1 hora.

O tampão foi trocado por diálise em 10 volumes de Tris 10 mM pH 8,1. Foram necessárias duas trocas de tampão para reduzir suficiente-

mente a força iônica da solução. A solução de proteína foi então filtrada através de um filtro de acetato de celulose de 1,5 μ m e carregada em uma coluna de troca aniônica POROS 50HQ (volume do leito 8 ml). A proteína foi eluída com um gradiente linear de NaCl 0 - 500. O complexo HLA-A*0201-peptídeo eluiu a aproximadamente 250 mM de NaCl, e as frações de pico foram recolhidas, um coquetel de inibidores de protease (Calbiochem) foi adicionado e as frações foram resfriadas em gelo.

As moléculas pMHC traçadas por biotinylation tiveram o tampão trocado por Tris 10 mM pH 8,1, NaCl 5 mM usando uma coluna de dessalinização rápida Pharmacia equilibrada no mesmo tampão. Imediatamente depois da eluição, as frações contendo proteína foram resfriadas e gelo e um coquetel de inibidores de protease (Calbiochem) foi adicionado. Foram então adicionados reagentes de biotinylation: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado até pH 8), $MgCl_2$ 7,5 mM, e 5 μ g/ml da enzima BirA (purificada de acordo com O'Callaghan *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* **266**: 9-15). A mistura foi então deixada incubar à temperatura ambiente por uma noite.

As moléculas pHLA-A*0201 biotiniladas foram purificadas usando cromatografia por filtração em gel. Uma coluna Superdex 75 HR 10/30 Pharmacia foi previamente equilibrada com PBS filtrado e 1 ml da mistura reacional de biotinylation foi carregado e a coluna foi desenvolvida com PBS a 0,5 ml/min. As moléculas pHLA-A*0201 biotiniladas eluíram como um pico único a aproximadamente 15 ml. As frações contendo proteína foram reunidas, resfriadas em gelo, e um coquetel de inibidores de protease foi adicionado. A concentração de proteína foi determinada usando um ensaio de ligação de Coomassie (PerBio) e alíquotas das moléculas pHLA-A*0201 biotiniladas foram armazenadas congeladas a -20°C. Estreptavidina foi imobilizada por métodos tradicionais de acoplamento de amina.

Estes complexos imobilizados são capazes de ligar tanto os receptores de células-T quanto o co-receptor CD8 $\alpha\alpha$, ambos podendo ser injetados na fase solúvel. Ligação específica do TCR é obtida mesmo a concentrações baixas (pelo menos 40 μ g/ml), sugerindo que o TCR é relativamente estável. Observa-se que as propriedades de ligação de sTCR a p-

MHC são qualitativa e quantitativamente similares se o sTCR for usado isolado na fase solúvel ou na fase imobilizada. Este é um controle importante para a atividade parcial das espécies solúveis e também sugere que complexos de pMHC biotiniladas são biologicamente tão ativos quanto complexos não biotinilados.

As interações entre TCRs MEL solúveis contendo uma nova ligação intercadeias e seu pMHC cognato ou uma combinação de pMHC irrelevante, cuja produção está descrita acima, foram analisadas em um biossensor de ressonância de plasmônio de superfície (SPR) Biacore 3000®. A SPR mede as alterações no índice de refração expressas em unidades de resposta (RU) próximas a uma superfície do sensor em uma célula de fluxo pequeno, um princípio que pode ser usado para detectar interações de receptor ligando e para analisar sua afinidade e seus parâmetros cinéticos. As células de fluxo de teste foram preparadas por imobilização dos complexos HLA-peptídeo individuais em células de fluxo separadas por meio da ligação entre a biotina ligada em forma cruzada a β 2m e estreptavidina que foram quimicamente ligadas de forma cruzada à superfície ativada das células de fluxo. O ensaio foi então realizado passando sTCR pelas superfícies das diferentes células de fluxo a uma taxa de fluxo constante, e assim medindo a resposta à SPR.

Como medir a constante de ligação de equilíbrio

Diluições sucessivas do sTCR MEL do tipo selvagem ou alterado foram preparadas e injetadas a uma taxa de fluxo constante de 5 μ l/min em duas células de fluxo diferentes; uma revestida com ~1000 RU do complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 específico, a segunda revestida com ~100 RU do complexo HLA-A2 -peptídeo inespecífico. A resposta foi normalizada para cada concentração usando a medida da célula de controle. A resposta dos dados normalizados foi representada graficamente versus a concentração da amostra de TCR e ajustada a uma hipérbole para calcular a constante de ligação de equilíbrio, K_D . (Price & Dwek, *Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists* (2nd Edition) 1979, Clarendon Press, Oxford).

Como medir parâmetros cinéticos

Para TCRs de alta afinidade o K_D foi determinado medindo-se experimentalmente a constante da taxa de dissociação, k_d , e a constante da taxa de associação, k_a . A constante de equilíbrio K_D foi calculada como k_d/k_a .

TCR foi injetado em duas células diferentes, uma revestida com ~300 RU do complexo HLA-A2-AAGIGILTV específico, a segunda revestida com ~300 RU do complexo HLA-A2 -peptídeo inespecífico. A taxa de fluxo foi ajustada em 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tipicamente foram injetados 250 μl de TCR a uma concentração de ~3 μM . Tampão foi então circulado até a resposta retornar à linha basal. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando o software Biaevaluation. A fase de dissociação também foi ajustada a uma equação de decomposição exponencial simples permitindo o cálculo da meia-vida.

Resultados

A interação entre um TCR MEL do tipo selvagem solúvel e ligado a dissulfeto (consistindo nas cadeias α e β de TCR descritas em detalhes nas SEQ ID N^{os} 9 e 10 respectivamente) e o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 foi analisada usando os métodos acima e apresentou um K_D de 4 μM . (Vide figura 12 para a curva de resposta Biacore).

TCRs contendo o uso da região variável especificado na tabela a seguir apresentam um K_D menor ou igual a 3 μM . Com base em experiências com TCRs de alta afinidade diferentes dos TCRs MEL da presente invenção (vide por exemplo Li *et al.*, *Nature Biotech* 2005 **23** (3): 349-354) espera-se que alguns ou todos os TCRs especificados na tabela a seguir tenham um k_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou mais baixo, e na verdade isto mostrou ser o caso pela preparação de TCRs solúveis compreendendo estes domínios variáveis (vide Tabela 1 abaixo).

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID N ^o	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID N ^o
11	2
12	2
13	2
14	2

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID Nº	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID Nº
15	2
16	2
17	2
18	2
19	2
20	2
21	2
22	2
23	2
24	2
47	2
48	2
49	2
50	2
51	2
52	2
53	2
11	54
11	55
11	56
11	57
11	58
11	59
11	60
11	61
11	62
11	63
11	64

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID Nº	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID Nº
11	65
11	66
11	67

Seqüência da região variável da cadeia-alfa SEQ ID Nº	Seqüência da região variável da cadeia-beta SEQ ID Nº	Afinidade (KD) nM	Taxa de separação ("off-rate") (Koff) 1/s
11	2	6,4	$3,26 \times 10^{-3}$
47	2	6,1	$1,21 \times 10^{-3}$
48	2	3,2	$6,56 \times 10^{-4}$
53	2	10,6	$1,8 \times 10^{-3}$
11	54	0,42	$2,3 \times 10^{-4}$
11	55	0,52	$2,04 \times 10^{-3}$
11	56	0,82	$2,2 \times 10^{-4}$
11	57	0,61	$1,73 \times 10^{-4}$
11	58	0,40	$1,55 \times 10^{-4}$
11	62	0,57	$2,06 \times 10^{-4}$
11	65	1,0	$1,14 \times 10^{-4}$
11	66	1,9	$1,62 \times 10^{-4}$

Tabela 1 – Dados da Biacore para a interação de TCRs MEL solúveis, de alta afinidade e ligados a dissulfeto compreendendo regiões variáveis definidas e o AAGIGILTV-HLA-A*0201 peptídeo-MHC cognato.

Exemplo 5 – Produção de uma proteína de fusão de TCR MEL de alta afinidade solúvel - IL-2 humana WT

Os métodos substancialmente como descritos nos exemplos 1 a 3 podem ser usados para produzir uma proteína de fusão de TCR MEL de alta afinidade solúvel - IL-2 humana WT. Em resumo, o DNA codificando o ligador desejado e a IL-2 humana WT são adicionados à extremidade 3' da

seqüência de DNA da cadeia-beta do TCR MEL do tipo selvagem solúvel e ligado a dissulfeto imediatamente antes do códon TAA ("de terminação"). A figura 9b mostra a seqüência de aminoácidos de uma proteína de fusão compreendendo uma cadeia-beta do TCR MEL do tipo selvagem ligado a dissulfeto fundida à IL-2 humana WT via uma seqüência ligadora (SEQ ID Nº 30). A porção ligadora e a porção IL-2 desta proteína de fusão estão indicadas em itálico. O DNA codificando esta construção pode ser então ligado ao pEX202. A proteína de fusão de TCR MEL de alta afinidade - IL-2 pode ser então expressa combinando-se esta proteína de fusão de cadeia-beta com uma cadeia alfa do TCR MEL de alta afinidade solúvel e ligado a dissulfeto contendo qualquer uma das regiões variáveis descritas em detalhes na figura 6 (SEQ ID Nºs: 11 – 24) usando os métodos substancialmente da maneira descrita no exemplo 3. Por exemplo, a figura 9a (SEQ ID Nº 29) mostra a seqüência de aminoácidos de uma cadeia-alfa do TCR MEL de alta afinidade solúvel e ligado a dissulfeto contendo a região variável descrita em detalhes nas SEQ ID Nº 11.

Exemplo 6 – Ensaio ELISPOT para avaliar a inibição in vitro da ativação de células-T citotóxicas (CTL) por TCRs Mel C1cWT Mel de alta afinidade solúveis

O método a seguir proporciona um meio de avaliação da capacidade de TCRs Mel de alta afinidade Mel c1 cWT para inibir a ativação de clones de células-T reativos com AAGIGILTV-HLA-A*0201.

O TCR Mel de alta afinidade solúvel Mel c1 cWT utilizado nesta experiência continha o domínio variável da cadeia-alfa do TCR Mel e regiões variáveis da cadeia-beta do TCR Mel WT de (SEQ ID Nº 11) e (SEQ ID Nº 2) respectivamente. As seqüências de aminoácidos completas das cadeia-alfa e beta de TCR deste TCR solúvel e ligado a dissulfeto estão mostradas na figura 9a (SEQ ID Nº 29) e na figura 5b (SEQ ID Nº 10) respectivamente.

Reagentes:

Meio de ensaio: 10% de FCS (heat-inactivated, Gibco, cat# 10108-165), 88% de RPMI 1640 (Gibco, cat# 42401-018), 1% de glutamina (Gibco, cat# 25030-024) e 1% penicilina/estreptomicina (Gibco, cat# 15070-063).

Tampão de lavagem: 0,01 M de PBS/0,05% de Tween 20 (1 sachê de solução salina tamponada com fosfato com Tween 20, pH 7,4 da Sigma, Cat. # P-3563 dissolvido em 1 litro de água destilada dá a composição final 0,01 M de PBS, 0,138 M de NaCl, 0,0027 M de KCl, 0,05 % de Tween 20).

PBS (Gibco, cat#10010-015).

Kit Diaclone EliSpot (IDS): O kit EliSpot contém todos os outros reagentes necessários, isto é, anticorpos de captura e de detecção, leite em pó desnatado, BSA, estreptavidina-fosfatase alcalina, solução de BCIP/NBT (IFN- γ humano PVDF Eli-spot 20 x 96 cavidades com placas (IDS cat# DC-856.051.020, DC-856.000.000).

O método a seguir baseia-se nas instruções dos fabricantes fornecidas com cada kit mas contém algumas alterações.

Método

100 μ l de anticorpo de captura foram diluídos em 10 ml de PBS estéril por placa. 100 μ l do anticorpo de captura diluído foram divididos em alíquotas e introduzidos em cada cavidade e deixados por uma noite a 4°C, ou por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 450 μ l de tampão de lavagem, lavadora de placas de 96 cavidades Ultrawash, (Thermo Life Sciences) para remover o excesso de anticorpo de captura. 100 μ l de leite desnatado a 2% foram então adicionados a cada cavidade. (Um frasco de leite em pó desnatado fornecido com o kit ELISPOT foi dissolvido em 50 ml de PBS estéril). As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por duas horas antes de serem lavadas mais três vezes com 450 μ l de tampão de lavagem, lavadora de placas de 96 cavidades Ultrawash, (Thermo Life Sciences).

Células cancerosas alvo Mel 624 e Mel 526 foram desprendidas de seus balões de cultura de tecido usando tripsina, lavadas uma vez por centrifugação (280 x g por 10 minutos) em meio de ensaio e ressuspensas a 1×10^6 /ml no mesmo meio. 50 μ l desta suspensão foram então adicionados à placa de ensaio para dar um número total de células-alvo de 50.000 células/cavidade.

Células-alvo T2 pulsadas com ELAGIGILTV também foram usadas como controle. Este peptídeo análogo foi usado já que ele tem maior afinidade para HLA-A*0201 do que o peptídeo WT.

Estas células pulsadas com peptídeo foram lavadas uma vez por centrifugação (280 x g por 10 minutos) em meio de ensaio e ressuspensas a 1×10^6 /ml no mesmo meio. 50 μ l desta suspensão foram então adicionados à placa de ensaio para dar um número total de células-alvo de 50.000 células/cavidade.

Um clone de células-T (KA/C5) (células efetoras), produzido por estimulação autóloga com o peptídeo ELAGIGILTV, foi colhido por centrifugação (280 x g por 10 minutos) e ressuspendido a 1×10^5 células/ml no meio de ensaio para dar 5000 células/cavidades quando 50 μ l foram adicionados à placa de ensaio.

Os TCRs Mel de alta afinidade solúveis do TCR Mel de alta afinidade Mel c1 cWT foram diluídos no meio de ensaio a uma concentração de 3x para dar uma concentração final de 1x quando 50 μ l foram adicionados à placa em um volume final de 150 μ l. A faixa de concentração dos TCRs Mel de alta afinidade testados foi de 1 μ M- 1 nM.

Foram então preparados cavidades contendo os seguintes itens (o volume de reação final em cada cavidade foi de 100 μ l):

Amostras de teste (adicionadas em ordem)

50 μ l de células-alvo Mel 624 ou Mel 526.

50 μ l da concentração desejada de TCRs Mel c1 cWT de alta afinidade solúveis.

50 μ l de células efetoras do clone da célula T KA/C5.

Controles negativos

50 μ l de células-alvo

50 μ l da concentração mais alta de TCRs Mel c1 cWT de alta afinidade solúveis.

50 μ l de meio de ensaio e

50 μ l de células efetoras

50 μ l da concentração mais alta de TCRs Mel c1 cWT de alta

afinidade solúveis

50 µl de meio de ensaio e

50 µl de células efetoras

50 µl de células-alvo

50 µl da concentração mais alta solúvel de um mTCr de alta afinidade (específico para HLA-A*0201- Tax) irrelevante

50 µl de meio de ensaio

Controles positivos

50 µl de células-alvo Mel 624, Mel 526, ou T2 pulsadas com peptídeo

50 µl de células efetoras

50 µl de meio de ensaio

As placas foram então incubadas por uma noite a 37°C/5% CO₂.

As placas foram então lavadas seis vezes com tampão de lavagem antes de ser extraído o excesso de tampão. 550 µl de água destilada foram então adicionados a cada frasco de anticorpo de detecção fornecido com o kit ELISPOT para preparar uma solução diluída. 100 µl da solução diluída de anticorpo de detecção foram então ainda diluídos em 100 ml de PBS/1% de BSA por placa e 100 µl da solução diluída de anticorpo de detecção foram divididos em alíquotas e introduzidos em cada cavidade. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 90 minutos.

Depois deste período as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (três vezes com 450 µl de tampão de lavagem, lavadora de placa de 96 cavidades Ultrawash (Thermo Life Sciences) e drenadas até a secura. 10 µl de estreptavidina-fosfatase alcalina foram então diluídos com 10 ml de PBS/1% de BSA por placa e 100 µl da estreptavidina diluída foram adicionados a cada cavidade e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram então novamente lavadas três vezes com 450 µl de tampão de lavagem e drenadas até a secura.

100 µl da solução suprida com BCIP/NBT foram adicionados a cada cavidade e as placas foram cobertas com folha de alumínio e deixadas desenvolver por 5 - 15 minutos. As placas foram verificadas regularmente

durante este período quanto à formação de manchas para decidir quando terminar a reação.

As placas foram então lavadas vigorosamente com água doce e sacudidas antes de serem colocadas de lado e deixadas secar sobre a bancada.

Uma vez secas, as placas foram lidas usando uma leitora ELISPOT (Autoimmun Diagnostika, Alemanha).

O número de manchas que apareceram em cada cavidade é proporcional ao número de células-T ativadas. Portanto, qualquer redução no número de manchas nas cavidades contendo o TCR Mel de alta afinidade indica inibição da ativação do clone KA/C5 CTL.

Resultados

Como mostrado na figura 16 os TCRs Mel de alta afinidade solúveis c1 cWT foram eficazes em inibir a ativação do clone KA/C5 CTL. Estes dados indicam que foi obtido 100% de inibição da ativação de CTL usando 1 μ M de TCRs Mel de alta afinidade solúveis c1 cWT.

Exemplo 7 – Comparação dos níveis de expressão de TCR em células Jurkat transfectadas com DNA otimizado com códon e DNA não otimizado com códon codificando um TCR MEL de alta afinidade (c1 α WT β) 4 x 10⁶ células Jurkat cultivadas em RPMI contendo 10% de células de meio de soro de bezerro fetal inativadas com calor foram lavadas em meio livre de soro e transfectadas com:

a) 5 μ g de plasmídio livre de endotoxina pCIneo contendo a sequência não otimizada com códon codificando a cadeia do TCR mutante de comprimento integral MEL α c1 mais 5 μ g de plasmídio livre de endotoxina pCI contendo a sequência não otimizada com códon codificando a cadeia do TCR de comprimento integral MEL β wt (as ORFs destas sequências estão mostradas na figura 18 (SEQ ID Nº 46) e na figura 17b (SEQ ID Nº 45) respectivamente); ou

b) 5 μ g de plasmídio livre de endotoxina pCIneo contendo uma cadeia do TCR mutante de comprimento integral MEL α c1 otimizada com códon de ORF mais 5 μ g de plasmídio livre de endotoxina pCI contendo

uma cadeia do TCR de comprimento integral MEL β otimizada com códon de ORF (as ORFs destas seqüências estão mostradas na figura 12a (SEQ ID Nº 33) e na figura 15a (SEQ ID Nº 39) respectivamente).

A transfecção foi obtida por eletroporação usando cubetas de 0,4 cm usando condições de 0,27 kV e 975 μ F em um aparelho Genepulser BioRad.

As células foram colocadas em 6 ml de RPMI contendo 20% de soro de bezerro fetal inativadas com calor a 37°C por 72 horas.

As células foram coloridas em um volume de 100 μ l de PBS usando 1 μ l (0,54 μ g) do tetrâmero estreptavidina p/HLA-A2 marcado com PE (o peptídeo foi o peptídeo de MEL heteroclítico ELAGIGILTV ou um peptídeo de NY-ESO de controle negativo SLLMWITQC).

Depois de 20 minutos à temperatura ambiente as células foram lavadas uma vez com 5 ml de RPMI e ressuspensas em 800 μ l de RPMI e analisadas em instrumento FC500 Beckman Coulter.

Resultados

Os dados de coloração com FACs mostrados na figura 19a e na figura 19b são o nível de coloração do tetrâmero de pMHC cognato obtido para células Jurkat transfectadas com o DNA não otimizado com códon e o DNA otimizado com códon codificando o TCR MEL c1 alfa / WT beta. Estes dados demonstraram que foi obtido um nível alto de expressão de superfície de TCR usando o DNA otimizado com códon comparado com aquele obtido usando o DNA não otimizado com códon correspondente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Avidex Ltd

Jakobsen, Bent K

Liddy, Nathaniel R

<120> RECEPTORES DE CÉLULAS-T MELANO-A DE ALTA AFINIDADE

<130> 77MG

<140> PCT/GB2006/001980

<141> 2006-05-31

<150> GB 0511124.0

<151> 2005-05-31

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu

115

<210> 3

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atgcaaaaag aagttgaaca aaattctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc      60
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtect tcttctggta cagacaatat      120
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgttc atatactcca atggtgacaa agaagatgga      180
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc      240
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgtgaacg ttgcaggcaa atcaaccttt      300
ggggatggga ctacgtcac  tgtgaagcca aatatccaga accctgaccc tgccgtgtac      360
cagctgagag actctaagtc gagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct      420
caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta      480
gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac      540
tttgcattgt caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc      600
ccagaaagtt cctaagcttg a                                     621

```

<210> 4

<211> 744

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

atgtctcaga ctattcatca atggccagcg accctgggtgc agcctgtggg cagcccgtc      60
tctctggagt gcactgtgga gggaacatca aaccccaacc tatactggta ccgacaggct      120
gcaggcaggg gcctccagct gctcttctac tccgttggtg ttggccagat cagctctgag      180
gtgccccaga atctctcagc ctccagaccc caggaccggc agttcatcct gagtcttaag      240
aagctcctcc tcagtgactc tggtttctat ctctgtgcct ggtccgagac agggttaggc      300
accggggagc tgtttttttg agaaggctct aggtgaccg tactggagga cctgaaaaac      360
gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa      420

```

```

aaggccacac tgggtgtgcct ggccaccggt ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg 480
tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag 540
cagccccccc tcaatgactc cagatacgct ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc 600
ttctggcagg acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 660
aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cccgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc 720
tggggtagag cagactaagc ttga 744

```

<210> 5

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile

100 105 110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser

115

120

125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val

130

135

140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu

145

150

155

160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser

165

170

175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile

180

185

190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

195

200

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

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

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 7

<211> 628

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em uma cadeia-alfa MEL TCR solúvel no códon Cys
apresentado e sítios de reconhecimento de enzimas restritas

<400> 7

tatacatatg caaaaagaag ttgaacaaaa ttctggaccc ctcaagtgtc cagagggagc	60
cattgcctct ctcaactgca cttacagtga ccgaggttcc cagtccttct tctggtacag	120
acaatattct gggaaaagcc ctgagttgat aatgttcata tactccaatg gtgacaaaga	180
agatggaagg ttacagcac agctcaataa agccagccag tatgtttctc tgctcatcag	240
agactccag cccagtgtt cagccaccta cctctgtgcc gtgaacgttg caggcaaata	300
aacctttggg gatgggacta cgctcactgt gaagccaaat atccagaacc ctgaccctgc	360
cgtgtaccag ctgagagact ctaagtgcag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt	420
tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaatg	480
tgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa	540
atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt	600
ccccagccca gaaagttcct aagcttga	628

<210> 8

<211> 751

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em uma cadeia-beta MEL TCR solúvel no códon Cys
apresentado e sítios de reconhecimento de enzimas restritas

<400> 8

```
tatacatatg tctcagacta ttcataatg gccagcgacc ctgggtgcagc ctgtgggcag      60
cccgctctct ctggagtga ctgtggaggg aacatcaaac cccaacctat actggtaccg      120
acaggctgca ggcagggggc tccagctgct cttctactcc gttggtattg gccagatcag      180
ctctgaggtg cccagaatc tctcagcctc cagaccccag gaccggcagt tcctcctgag      240
ttctaagaag ctctcctca gtgactctgg cttctatctc tgtgcctggg ccgagacagg      300
gttaggcacc ggggagctgt tttttggaga aggtcttagg ctgaccgtac tggaggacct      360
gaaaaacgtg ttcccacccg aggtcgtgtg gtttgagcca tcagaagcag agatctccca      420
cacccaaaag gccacactgg tgtgcctggc caccggtttc taccgacgacc acgtggagct      480
gagctggtgg gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagccctt      540
caaggagcag cccgccctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgagggtctc      600
ggccaccttc tggcaggacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct      660
ctcggagaat gacgagtgga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc      720
cgaggcctgg ggtagagcag actaagcttg a                                     751
```

<210> 9

<211> 204

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Solução de cadeia-alfa Mel TCR apresentando resíduo Cys

<400> 9

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

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

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 245

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Solução de cadeia-beta Mel TCR apresentando resíduo Cys

<400> 10

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro
20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu
35 40 45

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

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 11

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asp Gly Gly

85 90 95

Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 12

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Gly Gly

85

90

95

Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 13

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asp Ala Gly

85

90

95

Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 14

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asp Gly Gly

85

90

95

Lys Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 15

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asp Gly Gly

85

90

95

Arg Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 16

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Ile Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Gly Gly

85

90

95

Tyr Leu Leu Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 17

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Pro Gly Gly

85

90

95

Val Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 18

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Pro Gly Gly

85 90 95

Leu Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 19

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 19

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Gly Asn

85 90 95

His Met Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 20

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Leu Ser Pro

85

90

95

Gly Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 21

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 21

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Gly Val

85

90

95

Ile Leu Arg Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 22

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asn Gly Met

85

90

95

Pro Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 23

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 23

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Gly Leu

85

90

95

Ile Leu Leu Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 24

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Glu Arg

85

90

95

Pro Arg Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 25

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1

5

10

15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

20

25

30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys

35

40

45

<210> 26

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

1

5

10

15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

20

25

30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

35

40

45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val

50

55

<210> 27

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val

50 55

<210> 28

<211> 3857

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de DNA do plasmídeo PEX202

<400> 28

gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc actataggga gaccacaacg gtttcctct	60
agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga gatatacata tgcagaagga agtggagcag	120
aactctggac ccctcagtgt tccagaggga gccattgcct ctctcaactg cacttacagt	180
gaccgaggtt cccagtcctt cttctggtac agacaatatt ctgggaaaag ccctgagttg	240
ataatgtcca tatactccaa tggtgacaaa gaagatggaa ggtttacagc acagctcaat	300
aaagccagcc agtatgtttc tctgctcatc agagactccc agcccagtga ttcagccacc	360

tacctctgtg ccggttacaac tgacagctgg gggaaattgc agtttgagc agggacccag	420
gttggtggtca cccagatat ccagaaccct gaccctgccg tgtaccagct gagagactct	480
aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc accgattttg attctcaaac aaatgtgtca	540
caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg	600
gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac	660
gccttcaaca acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccaga aagttcccc	720
gggggtagaa tcgcccggct ggaggaaaaa gtgaaaacct tgaaagctca gaactcggag	780
ctggcggtcca cgccaacat gctcagggaa caggtggcac agcttaaaca gaaagtcag	840
aactactagg atccatggtg agcttgaatt ccgatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg	900
aagctgagtt ggctgctgcc accgtgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta	960
aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggataa ttcttgaaga	1020
cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct	1080
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg tttattttcc	1140
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa	1200
tattttgtta aaatcgcgt taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc	1260
cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggg tgagtgttgt	1320
tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa	1380
aacggtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca ccctaatcaa gttttttggg	1440
gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg	1500
acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc	1560
tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccg ccgcgcttaa	1620
tgcgccgcta cagggcgct caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat	1680
ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata	1740
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct	1800
tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgc caccagaaa cgctggtgaa	1860
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa	1920
cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	1980
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg	2040
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca	2100
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgc gccataacca tgagtgataa	2160
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt	2220
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc	2280

cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa 2340
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag actggatgga 2400
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc 2460
 tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 2520
 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 2580
 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 2640
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt cttttttaat ttaaaaggat 2700
 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcggt 2760
 ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 2820
 ggcgctaata tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 2880
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 2940
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 3000
 gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 3060
 gtgtcttacc ggggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 3120
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 3180
 cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 3240
 tccggtaaac ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 3300
 ctgggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 3360
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt 3420
 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 3480
 ggataaccgt attacgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 3540
 gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgctg atgcggtatt ttctccttac 3600
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcaatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc 3660
 gcatagttaa gccagtatac actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc 3720
 gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 3780
 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 3840
 cgaaacgcgc gaggcag 3857

<210> 29

<211> 204

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa Mel TCR solúvel de alta afinidade

<400> 29

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Asp Gly Gly

85 90 95

Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile

100 105 110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser

115 120 125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val

130 135 140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu

145 150 155 160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser

165

170

175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile

180

185

190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

195

200

<210> 30

<211> 380

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta solúvel em Mel TCR solúvel apresentando resíduo Cys fundido através de ligação peptídica a um tipo humano selvagem IL-2

<400> 30

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp Pro Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys

245	250	255
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu		
260	265	270
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr		
275	280	285
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln		
290	295	300
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala		
305	310	315
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile		
325	330	335
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys		
340	345	350
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp		
355	360	365
Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
370	375	380

<210> 31

<211> 839

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em toda a extensão de um códon otimizado WT sem.

uma cadeia-alfa MEL TCR

<400> 31

```

ctcgagccgc caccatgatg aagagcctgc gggtgctgct ggtgatoctg tggctgcagc      60
tgagctgggt gtggagccag cagaaggagg tggagcagaa cagcggcccc ctgagcgtgc      120
ccgagggcgc catcgccagc ctgaactgca cctacagcga ccggggcagc cagagcttct      180
tctggatatcg gcagtacagc ggcaagagcc ccgagctgat tatgttcata tacagcaacg      240
gcgacaagga ggacggcccg ttcaccgccc agctgaacaa ggccagccag tatgtgagcc      300
tgctgatccg ggacagccag cccagcgaca gcgccacctt cctgtgcgcc gtgaacgtgg      360
ctgggaagag caccttcggc gacggcacca ccctgaccgt gaagcccaac atccagaacc      420
ccgaccccgcc cgtgtaccag ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagtct gtgtgcctgt      480
tcaccgactt cgacagccag accaatgtga gccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca      540
ccgacaagac cgtgctggac atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct      600
ggagcaacaa gagcgacttc gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg      660
acaccttttt ccccagcccc gagagcagct gcgacgtgaa actggtggag aagagcttcg      720
agaccgacac caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat cggcttcaga atcctgctgc      780
tgaaagtggc tgggttcaac ctgctgatga ccctgcggct gtggagcagc taaacgcgt      839

```

<210> 32

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu

1

5

10

15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro

20

25

30

Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser

35

40

45

Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys

50

55

60

Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp

65

70

75

80

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu

85

90

95

Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala

100

105

110

Val Asn Val Ala Gly Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr

115

120

125

Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130

135

140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

145

150

155

160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165

170

175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

180

185

190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

195

200

205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210

215

220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260 265 270

<210> 33

<211> 839

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em toda a extensão de um códon otimizado de alta afinidade em uma cadeia-alfa Mel TCR

<400> 33

ctcgagccgc caccatgatg aagagcctgc ggggtgctgct ggtgatcctg tggctgcagc	60
tgagctgggt gtggagccag cagaaggagg tggagcagaa cagcggcccc ctgagcgtgc	120
ccgagggcgc catcgccagc ctgaactgca cctacagcga ccggggcagc cagagcttct	180
tctggtatcg gcagtacagc ggcaagagcc ccgagctgat tatgttcac tacagcaacg	240
gcgacaagga ggacggcccg ttcaccgccc agctgaacaa ggccagccag tatgtgagcc	300
tgctgatccg ggacagccag cccagcgaca gcgccaccta cctgtgcgcc gtgaacgacg	360
gcggcagact gaccttcggc gacggcacca ccctgaccgt gaagcccaac atccagaacc	420
ccgaccccg cgtgtaccag ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagtct gtgtgcctgt	480
tcaccgactt cgacagccag accaatgtga gccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca	540
ccgacaagac cgtgctggac atgcgggaca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct	600
ggagcaacaa gagcgacttc gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatc atccccgagg	660
acaccttttt cccagcccc gagagcagct gcgacgtgaa actggtggag aagagcttcg	720
agaccgacac caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat cggcttcaga atcctgctgc	780
tgaaagtggc tgggttcaac ctgctgatga ccctgcggct gtggagcagc taaacgcgt	839

<210> 34

<211> 272

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Extensão de um códon otimizado de alta afinidade em uma cadeia-alfa
Mel TCR

<400> 34

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro

20 25 30

Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser

35 40 45

Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys

50 55 60

Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp

65 70 75 80

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu

85 90 95

Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala

100 105 110

Val Asn Asp Gly Gly Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr

115 120 125

Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130

135

140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

145

150

155

160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165

170

175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

180

185

190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

195

200

205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210

215

220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

225

230

235

240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

245

250

255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260

265

270

<210> 35

<211> 839

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em toda a extensão de um códon otimizado WT sem
uma cadeia-alfa MEL TCR

<400> 35

```

ctcgagccgc caccatgatg aagagcctgc gggtgctgct ggtgatcctg tggctgcagc      60
tgagctgggt gtggagccag cagaaggagg tggagcagaa cagcggcccc ctgagcgtgc      120
ccgagggcgc catcgccagc ctgaactgca cctacagcga ccggggcagc cagagcttct      180
tctggtatcg gcagtacagc ggcaagagcc ccgagctgat tatgttcacg tacagcaacg      240
gcgacaagga ggacggccgg ttcaccgccc agctgaacaa ggccagccag tatgtgagcc      300
tgctgatccg ggacagccag cccagcgaca gcgccaccta cctgtgcgcc gtgaacgacg      360
gcggcagaag caccttcggc gacggcacca ccctgaccgt gaagcccaac atccagaacc      420
ccgaccccg cgtgtaccag ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagtct gtgtgcctgt      480
tcaccgactt cgacagccag accaatgtga gccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca      540
ccgacaagac cgtgctggac atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct      600
ggagcaacaa gagcgacttc gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatc atccccgagg      660
acaccttttt cccagcccc gagagcagct gcgacgtgaa actggtggag aagagcttcg      720
agaccgacac caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat cggcttcaga atcctgctgc      780
tgaaagtggc tgggttcaac ctgctgatga ccctgcggct gtggagcagc taaacgcgt      839

```

<210> 36

<211> 272

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa MEL TCR com a lta afinidade em toda extensão

<400> 36

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro

20 25 30

Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser

35	40	45
Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys		
50	55	60
Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp		
65	70	75
Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu		
85	90	95
Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala		
100	105	110
Val Asn Asp Gly Gly Arg Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr		
115	120	125
Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg		
130	135	140
Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp		
145	150	155
Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr		
165	170	175
Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser		
180	185	190
Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
195	200	205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210

215

220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

225

230

235

240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

245

250

255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260

265

270

<210> 37

<211> 839

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em toda a extensão de um códon otimizado de alta
afinidade em uma cadeia-alfa MEL TCR

<400> 37

ctcgagccgc caccatgatg aagagcctgc ggggtgctgct ggtgatacctg tggctgcagc	60
tgagctgggt gtggagccag cagaaggagg tggagcagaa cagcgccccc ctgagcgtgc	120
ccgagggcgc catcgccagc ctgaactgca cctacagcga ccggggcagc cagagcttct	180
tctggtatcg gcagtacagc ggcaagagcc ccgagctgat tatgttcac tacagcaacg	240
gcgacaagga ggacggccgg ttcaccgccc agctgaacaa ggccagccag tatgtgagcc	300
tgctgatccg ggacagccag cccagcgaca gcgccaccta cctgtgcgcc gtgaacgtgg	360
gctgatacct gctgttcggc gacggcacca ccctgaccgt gaagcccaac atccagaacc	420
ccgacccgc cgtgtaccag ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagtct gtgtgcctgt	480
tcaccgactt cgacagccag accaatgtga gccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca	540
ccgacaagac cgtgctggac atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct	600
ggagcaacaa gagcgacttc gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatc atccccgagg	660
acaccttttt ccccagcccc gagagcagct gcgacgtgaa actggtggag aagagcttcg	720

agaccgacac caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat cggcttcaga atcctgctgc 780
 tgaaagtggc tgggttcaac ctgctgatga ccctgcggct gtggagcagc taaacgcgt 839

<210> 38

<211> 272

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa MEL TCR com alta afinidade em toda extensão

<400> 38

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro
 20 25 30

Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
 35 40 45

Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys
 50 55 60

Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp
 65 70 75 80

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu
 85 90 95

Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110

Val Asn Val Gly Leu Ile Leu Leu Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr

115

120

125

Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130

135

140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

145

150

155

160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165

170

175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

180

185

190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

195

200

205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210

215

220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

225

230

235

240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

245

250

255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260

265

270

<210> 39

<211> 956

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Codificação de DNA em toda a extensão de um códon otimizado WT sem uma cadeia-alfa MEL TCR

<400> 39

```

ggatccgccg ccaccatgct gtgcagcctg ctggccctgc tgctgggcac cttcttcgga      60
gtgcggagcc agaccatcca ccagtggccc gccacactgg tgcagcctgt gggcagcccc      120
ctgagcctgg agtgcaccgt ggagggcacc agcaaccca acctgtactg gtatcggcag      180
gccgcaggga gggggctgca gctgctgttc tactctgtgg gcatcggcca gatcagcagc      240
gaggtgcccc agaacctgag cgctccagg cccagagacc ggcagttcat cctgagcagc      300
aagaagctgc tgctgagcga cagcggcttc tacctgtgcg cctggagcga gaccggcctg      360
ggcaccggcg agctgttctt cggcgagggc tccaggctga ccgtgctgga ggacctgaag      420
aacgtgttcc cccccgaggt ggccgtgttc gagcccagcg aggccgagat cagccacacc      480
cagaaggcta ccctggtgtg tctggccacc ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgtcc      540
tggtgggtga acggcaagga ggtgcacagc ggctgttcta ccgaccccca gccctgaag      600
gagcagcccc ccctgaacga cagccggtac tgctgtctct ccagactgag agtgagcgcc      660
accttctggc agaacccccg gaaccacttc cggtgccagg tgcagttcta cggcctgagc      720
gagaacgacg agtggacca ggaccgggcc aagcccgta cccagattgt gagcgccgag      780
gcctggggca gagccgactg cggcttcacc agcgagagct accagcaggg cgtgctgagc      840
gccaccatcc tgtacgagat cctgctgggc aaggccaccc tgtacgccgt gctggtgtct      900
gccctggtgc tgatggctat ggtgaagcgg aaggacagcc ggggctaagc ggccgc      956

```

<210> 40

<211> 310

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Toda extensão WT da cadeia-beta MEL TCR

<400> 40

Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val

1

5

10

15

Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

20

25

30

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

35

40

45

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

50

55

60

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

65

70

75

80

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

85

90

95

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

100

105

110

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

115

120

125

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

130

135

140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

145

150

155

160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

245

250

255

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

260

265

270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr

275

280

285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys

290

295

300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305

310

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Pequena ligação scTCR

<400> 41

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

20 25 30

<210> 42

<211> 35

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Longa ligação scTCR

<400> 42

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Pro

35

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210> 44

<211> 816

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

atgatgaaat ccttgagagt tttactagtg atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg      60
agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttcaga gggagccatt      120
gcctctctca actgcactta cagtgaaccg ggttcccagt ctttcttctg gtacagacaa      180
tattctggga aaagccctga gttgataatg ttcataact ccaatggtga caaagaagat      240
ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac      300
tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtga acgttgcagg caaatcaacc      360
tttggggatg ggactacgct cactgtgaag ccaaataatc agaaccctga ccctgccgtg      420
taccagctga gagactctaa atccagtgc aagtctgtct gcctattcac cgattttgat      480
tctcaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg      540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgcgt tggcctggag caacaaatct      600
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc      660
agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac      720
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg      780
tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagc                                816

```

<210> 45

<211> 930

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

atgctctgct ctctccttgc cttctcctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact      60
attcatcaat ggccagcgac cctggtgcag cctgtgggca gcccgctctc tctggagtgc      120
actgtggagg gaacatcaaa cccaacctt tactggtacc gacaggctgc aggcaggggc      180
ctccagctgc tcttctactc cgttggtatt ggccagatca gctctgaggt gccccagaat      240
ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttcatoctga gttctaagaa gtcctcctc      300
agtgactctg gcttctatct ctgtgcctgg tccgagacag ggtaggcac cggggagctg      360
ttttttggag aaggctctag gctgaccgta ctggaggacc tgaaaaacgt gttcccaccc      420
gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg      480
gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg      540

```

aaggaggtgc acagtggggt cagcacagac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc 600
aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgaggggtct cggccacctt ctggcagaac 660
ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg 720
accaggata gggccaaacc tgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 780
gactgtggct tcacctcca gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat 840
gagatcttgc tagggaaggc caccttgtat gccgtgctgg tcagtgcctt cgtgctgatg 900
gccatggtca agagaaagga ttccagagggc 930

<210> 46

<211> 816

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> ORF cadeia-alfa MEL TCR Codificando um DNA de alta afinidade

<400> 46

atgatgaaat ccttgagagt ttctactagt atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg 60
agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttcaga gggagccatt 120
gcctctctca actgcactta cagtgaccga ggttccagct ccttcttctg gtacagacaa 180
tattctggga aaagccctga gttgataatg ttcatatact ccaatggtga caaagaagat 240
ggaagggtta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac 300
tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtga acgatggggg tcttcttacc 360
tttggggatg ggactacgct cactgtgaag ccaaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420
taccagctga gagactctaa atccagtgc aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
tctcaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct 600
gactttgcat gtgcaaagc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gttctgtgta tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg 780
tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagc 816

<210> 47

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 47

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Phe Gln Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 48

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 48

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Phe Leu Gly Ser Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 49

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 49

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Tyr Gln Gly Ala Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35 40 45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85 90 95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 50

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Ser Ile His Ala Gln

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 51

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 51

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asn Leu Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

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

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

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro
 100 105 110

<210> 52

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 52

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

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

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

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

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

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100

105

110

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-alfa Mel TCR de alta-afinidade

<400> 53

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Thr Tyr Arg Glu Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln His Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro

100 105 110

 <210> 54
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade
 <400> 54
 Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val
 1 5 10 15

 Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro
 20 25 30

 Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu
 35 40 45

 Phe Tyr Tyr Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn
 50 55 60

 Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys
 65 70 75 80

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

 Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
 100 105 110

 Thr Val Leu
 115

<210> 55

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 55

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Phe Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 56

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 56

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Phe Gly Pro Tyr Gly Gln Ile Ser Ser Glu Ala Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 57

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 57

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Trp Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 58

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 58

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Met Gly Gly Trp Gln Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 59

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 59

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Met Gly Gly Trp Ser Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 60

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 60

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Met Gly Gly Trp Ala Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 61

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 61

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Val Gly Gly Trp Asp Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 62

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 62

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Val Gly Gly Trp Glu Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 63

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 63

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Val Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Asn Thr Ser Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 64

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 64

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Asn Thr Asn Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 65

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 65

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Asn Leu Gly Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu

115

<210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 66

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Asn Val Ser Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu

115

<210> 67

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Domínio variável de cadeia-beta MEL TCR de alta-afinidade

<400> 67

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Asn Thr Thr Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu

115

<210> 68

<211> 204

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo

CYS apresentado

<400> 68

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Phe Gln Gly Ser Gln

	20		25		30
Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile					
	35		40		45
Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala					
	50		55		60
Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser					
	65		70		75 80
Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly					
	85		90		95
Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile					
	100		105		110
Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser					
	115		120		125
Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val					
	130		135		140
Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu					
	145		150		155 160
Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser					
	165		170		175
Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile					
	180		185		190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

195

200

<210> 69

<211> 204

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 69

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Phe Leu Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile

100

105

110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser

115

120

125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val

130

135

140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu

145

150

155

160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser

165

170

175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile

180

185

190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

195

200

<210> 70

<211> 204

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-alfa Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 70

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

1

5

10

15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

20

25

30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

35

40

45

Met Phe Thr Tyr Arg Glu Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

50

55

60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln His Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

65

70

75

80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Val Ala Gly

85

90

95

Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile

100

105

110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser

115

120

125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val

130

135

140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu

145

150

155

160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser

165

170

175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile

180

185

190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

195

200

<210> 71

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 71

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Tyr Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 72

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo

CYS apresentado

<400> 72

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Phe Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 73

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 73

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Phe Gly Pro Tyr Gly Gln Ile Ser Ser Glu Ala Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 74

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 74

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Pro Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Trp Gly Pro Phe Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 75

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 75

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20 25 30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35 40 45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50 55 60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85 90 95

Thr Gly Leu Gly Met Gly Gly Trp Gln Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 76

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
 CYS apresentado

<400> 76

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Gly Val Gly Gly Trp Glu Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 77

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 77

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Asn Leu Gly Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 78

<211> 245

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia-beta Mel. TCR solúvel de alta afinidade incluindo um resíduo
CYS apresentado

<400> 78

Met Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

1

5

10

15

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

20

25

30

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

35

40

45

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

50

55

60

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys

65

70

75

80

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Glu

85

90

95

Thr Gly Leu Asn Val Ser Gly Trp Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

100

105

110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val

115

120

125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

130

135

140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

145

150

155

160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln

165

170

175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His

195

200

205

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

210

215

220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala

225

230

235

240

Trp Gly Arg Ala Asp

245

REIVINDICAÇÕES

1. Receptor de células-T (TCR) com a propriedade de se ligar a AAGIGILTV-HLA-A*0201, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um domínio variável da cadeia α do TCR tendo uma SEQ ID N°:1, exceto aquele de um ou mais aminoácidos 28D, 29R, 30G, 31S, 49M, 51I, 53S, 54N, 72Y, 94V, 95A, 96G, 97K, 98S e 99T que é/são mutantes, e/ou pelo menos um domínio variável da cadeia β do TCR tendo uma SEQ ID N°:2, exceto aquele de um ou mais aminoácidos 45L, 51S, 52V, 53G, 54I, 76I, 100G, 101T, 102G, 103E, 104L e 105F que é/são mutantes, em que o referido TCR tem um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor ou igual a 3 μ M e/ou uma taxa de separação (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ou mais baixa.

2. TCR como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais mutações na região variável da cadeia-alfa selecionado entre 28D→F, 28D→Y, 28D→S, 28D→N, 29R→Q, 29R→L, 29R→I, 29R→F, 30G→H, 31S→A, 49M→I, 51I→T, 53S→R, 54N→E, 72Y→H, 94V→D, 94V→P, 94V→S, 94V→L, 94V→N, 95A→G, 95A→S, 95A→E, 96G→N, 96G→P, 96G→V, 96G→M, 96G→L, 96G→R, 97K→R, 97K→Y, 97K→V, 97K→L, 97K→H, 97K→G, 97K→I, 97K→P, 98S→L, 98S→M, 98S→R, 99T→L ou 99T→R usando a numeração mostrada na SEQ ID N° 1.

3. TCR como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais mutações na região variável da cadeia-beta selecionado entre 45L→P, 51S→Y, 51S→F, 51S→W, 52V→G, 53G→P, 54I→F, 54→Y, 76I→V, 100G→N, 101T→M, 101T→L, 101T→V, 102G→S, 102G→N, 102G→T, 103E→G, 104L→W, 105F→S, 105F→A, 105F→Q, 105F→D, ou 105F→E usando a numeração mostrada na SEQ ID N° 2.

4. TCR como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma das seqüências de aminoácidos da região variável da cadeia-alfa das SEQ ID N°s: 11 a 24 ou 47 a 53.

5. TCR como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato

de que compreende uma das seqüências de aminoácidos da região variável da cadeia-beta das SEQ ID N^os: 54 a 67.

6. TCR de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende os pares de regiões variáveis da cadeia-alfa e beta mostrados na tabela a seguir:

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID N ^o	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID N ^o
11	2
12	2
13	2
14	2
15	2
16	2
17	2
18	2
19	2
20	2
21	2
22	2
23	2
24	2
47	2
48	2
49	2
50	2
51	2
52	2
53	2
11	54
11	55
11	56
11	57

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID N°	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID N°
11	58
11	59
11	60
11	61
11	62
11	63
11	64
11	65
11	66
11	67

7. TCR como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a seqüência de aminoácidos da região constante da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 25, e/ou uma das seqüências da região constante de aminoácidos da cadeia-beta mostradas nas SEQ ID N°s: 26 e 27.

8. TCR solúvel, caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID N° 29 ou SEQ ID N°: 68 ou SEQ ID N°: 69 ou SEQ ID N°: 70, e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID N° 10.

9. TCR solúvel, caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID N° 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID N° 71 ou SEQ ID N°: 72 ou SEQ ID N°: 73 ou SEQ ID N°: 74 ou SEQ ID N°: 75 ou SEQ ID N°: 76 ou SEQ ID N°: 77 ou SEQ ID N°: 78.

Seqüência da região variável da cadeia-alfa, SEQ ID N°	Seqüência da região variável da cadeia-beta, SEQ ID N°
11	64
11	65
11	66
11	67

15. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 2.

16. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 47 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 2.

17. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 48 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 2.

18. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 53 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 2.

19. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 54.

20. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 55.

21. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 56.

22. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID N° 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID N° 57.

23. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a

região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 58.

24. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 62.

25. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 65.

26. TCR de acordo com a reivindicação 3, compreendendo a região variável da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 11 e a região variável da cadeia-beta mostrada na SEQ ID Nº 66.

27. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo ainda a seqüência de aminoácidos da região constante da cadeia-alfa mostrada na SEQ ID Nº 25, e/ou uma das seqüências da região constante de aminoácidos da cadeia-beta mostradas nas SEQ ID Nºs: 26 e 27.

28. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes que é um receptor de células-T dimérico (dTTCR) ou um receptor de células-T da cadeia simples (scTCR).

29. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 28 que é um scTCR compreendendo

um primeiro segmento constituído por uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma região variável da cadeia α do TCR

um segundo segmento constituído por uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma seqüência de aminoácidos correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, e

uma seqüência ligadora ligando o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

30. TCR de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 28 que é um scTCR compreendendo

um primeiro segmento constituído por uma sequência de amino-ácidos correspondendo a uma região variável da cadeia β do TCR

um segundo segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma sequência da região variável da cadeia α do TCR fundida ao terminal N de uma sequência de aminoácidos correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e

uma sequência ligadora ligando o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

10 31. TCR de acordo com a reivindicação 29 ou 30, compreendendo ainda uma ligação dissulfeto entre a ligação entre as primeira e segunda cadeias, a referida ligação dissulfeto sendo uma ligação que não possui equivalentes nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos, e onde o comprimento da sequência ligadora e a posição da ligação dissulfeto são tais
15 que as sequências do domínio variável dos primeiro e segundo segmentos são mutuamente orientadas substancialmente da mesma maneira que nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos.

20 32. scTCR como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 31, onde na parte de ligação a sequência ligadora liga o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

33. scTCR como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 32, onde na parte de ligação a sequência ligadora tem a fórmula -PGGG-(SGGGG)₅-P- (SEQ ID Nº 41) ou -PGGG-(SGGGG)₆-P- (SEQ ID Nº 42) onde P é prolina, G é glicina e S é serina.

25 34. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 5 a 28 que é um dTCR compreendendo

um primeiro polipeptídeo onde uma sequência correspondendo a uma sequência da região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma sequência correspondendo a uma sequência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e
30

um segundo polipeptídeo onde uma sequência correspondendo a uma sequência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N

uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, o primeiro e o segundo polipeptídios sendo ligados por uma ligação dissulfeto que não tem equivalentes nos receptores de células-T $\alpha\beta$ nativos.

5 35. TCR de acordo com a reivindicação 34, onde a ligação dissulfeto liga resíduos de aminoácidos das referidas seqüências do domínio constante, ligação dissulfeto esta que não tem equivalentes em TCRs nativos.

10 36. TCR de acordo com a reivindicação 35, onde a referida ligação dissulfeto está entre resíduos cisteína correspondentes a resíduos de aminoácidos cujos átomos de carbono β estão a menos de 0,6 nm de distância nos TCRs nativos.

15 37. TCR de acordo com a reivindicação 35, onde a referida ligação dissulfeto está entre resíduos cisteína substituindo a Thr 48 do exon 1 do TRAC*01 e a Ser 57 do exon 1 do TRBC1*01 ou TRBC2*01 ou o equivalente não humano do mesmo.

38. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 5 a 28 que é um dTCR compreendendo

20 um primeiro polipeptídio onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia α do TCR, e

25 um segundo polipeptídio onde uma seqüência correspondendo a uma seqüência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N uma seqüência correspondendo a uma seqüência extracelular do domínio constante da cadeia β do TCR, o primeiro e o segundo polipeptídios sendo ligados por uma ligação dissulfeto que não tem equivalentes na célula T $\alpha\beta$ -nativa entre resíduos cisteína substituindo a Thr 48 do exon 1 do TRAC*01 e a Ser 57 do exon 1 do TRBC1*01 ou TRBC2*01 ou o equivalente não hu-
30 mano do mesmo.

39. TCR de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 38, onde a parte de ligação do dTCR ou do scTCR inclui uma ligação dissul-

feto entre os resíduos correspondentes àqueles ligados por uma ligação dissulfeto nos TCRs nativos.

40. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 14 a 39, onde a parte de ligação do dTCR ou do scTCR não contém uma sequência correspondente a seqüências transmembranas ou citoplasmáticas dos TCRs nativos.

41. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10

10 42. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 68 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

43. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 69 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

44. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 70 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 10.

20 45. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 71.

46. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 72.

25 47. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 73.

30 48. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID Nº 74.

49. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID Nº 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-

beta de SEQ ID N° 75.

50. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID N° 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID N° 76.

5 51. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID N° 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-beta de SEQ ID N° 77.

52. TCR solúvel compreendendo a seqüência de aminoácidos da cadeia-alfa de SEQ ID N° 29 e a seqüência de aminoácidos da cadeia-
10 beta de SEQ ID N° 78.

53. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes onde o TCR é associado a pelo menos uma cadeia polialquile-
no glicol.

54. TCR de acordo com a reivindicação 53, onde a(s) cadeia(s)
15 polialquileno glicol é/são covalentemente ligadas ao TCR.

55. TCR de acordo com a reivindicação 53 ou reivindicação 54, onde a(s) cadeia(s) polialquileno glicol compreende(m) pelo menos duas unidades repetitivas polietileno glicol.

56. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo ainda uma cisteína reativa no terminal C ou no
20 terminal N das cadeias alfa ou beta do mesmo.

57. TCR de acordo com qualquer uma das reivindicações pre-
cedentes associado a um agente terapêutico ou a uma porção detectável.

58. TCR de acordo com a reivindicação 57, onde o TCR é cova-
25 lentemente ligado a um agente terapêutico ou a uma porção detectável.

59. TCR de acordo com a reivindicação 57, onde o agente tera-
pêutico ou a porção detectável é covalentemente ligada ao terminal C de
uma das cadeias do TCR ou de ambas.

60. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 57
30 a 59, associado a um agente terapêutico é uma molécula efetora imune.

61. TCR de acordo com a reivindicação 60, onde a molécula
efetora imune é uma citocina.

62. TCR de acordo com a reivindicação 60 onde a molécula efetora imune é IL-2, ou uma variante funcional ou um fragmento da mesma.

63. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 57 a 59, onde o agente terapêutico é um agente citotóxico.

5 64. TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 57 a 49, onde o agente terapêutico é um radionuclídeo.

65. Complexo de TCR multivalente compreendendo pelo menos dois TCRs como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

*
10 66. Complexo de TCR multivalente compreendendo pelo menos dois TCRs como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes ligados por uma cadeia de polímero não peptídica ou uma sequência ligadora peptídica.

15 67. Complexo de TCR de acordo com a reivindicação 65, onde a cadeia de polímero ou a sequência ligadora peptídica se estende entre os resíduos de aminoácidos de cada TCR que não estão localizados em uma sequência da região variável do TCR.

20 68. Complexo de TCR de acordo com uma das reivindicações 66 ou 67, onde os TCRs estão ligados por uma cadeia polialquileno glicol ou por um ligador peptídico derivado de um domínio de multimerização humano.

69. Complexo de TCR de acordo com a reivindicação 68, onde um radical espaçador alquileno divalente está localizado entre a cadeia polialquileno glicol e seu ponto de ligação a um TCR do complexo.

25 70. Complexo de TCR de acordo com a reivindicação 68 ou com a reivindicação 69, onde a cadeia polialquileno glicol compreende pelo menos duas unidades repetitivas polietileno glicol.

30 71. Complexo de TCR multivalente compreendendo pelo menos dois TCRs de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, onde (i) pelo menos um dos referidos TCRs está associado a um agente terapêutico de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 64.

72. Célula isolada apresentando um TCR como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 52.

73. Célula isolada de acordo com a reivindicação 72, que é uma célula T humana ou uma célula-tronco hematopoiética humana.

74. Ácido nucléico ou ácidos nucléicos codificando um TCR como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

5 75. Ácido nucléico ou ácidos nucléicos de acordo com a reivindicação 74, adaptados para expressão em uma célula bacteriana, de levedura, de mamífero ou de inseto.

10 76. Ácido nucléico ou ácidos nucléicos de acordo com a reivindicação 74, adaptado para expressão em uma célula T humana ou em uma célula-tronco hematopoiética humana.

15 77. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 76, consistindo em uma das seqüências de DNA da cadeia α do TCR de comprimento integral de SEQ ID N^{os}: 33, 35 ou 37 e a seqüência de DNA da cadeia β do TCR de SEQ ID N^o 39 ou um ácido nucléico complementar a mesma ou uma seqüência de RNA correspondente.

20 78. Composição farmacêutica compreendendo um TCR ou um complexo de TCR multivalente como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 71, ou uma pluralidade de células de acordo com as reivindicações 72 ou 73, ou um ácido nucléico ou ácidos nucléicos de acordo com as reivindicações 74 a 77 junto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

25 79. Método de tratamento de câncer compreendendo administrar a um indivíduo sofrendo de tal câncer uma quantidade eficaz de um TCR ou de um complexo de TCR multivalente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 71, ou de uma pluralidade de células de acordo com as reivindicações 72 ou 73, ou de um ácido nucléico ou ácidos nucléicos de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 77.

30 80. Uso de um TCR ou de um complexo de TCR multivalente de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 71, ou de uma pluralidade de células de acordo com as reivindicações 72 ou 73, ou de um ácido nucléico ou ácidos nucléicos de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 77 na preparação de uma composição para o tratamento de câncer.

81. Método para identificar um TCR de alta afinidade com a pro-

- priedade de se ligar ao AAGIGILTV-HLA-A*0201 caracterizado pelo fato de o TCR (i) compreender pelo menos um domínio variável da cadeia α do TCR e/ou pelo menos um domínio variável da cadeia β do TCR e (ii) ter um K_D para o referido complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201 menor que 3 μ M, o referido método compreendendo:
- 5 (a) a produção de uma biblioteca variada de TCRs compreendendo os domínios variáveis das cadeias α e β do TCR MEL onde um dos domínios variáveis das cadeias α e β ou ambos compreendem uma mutação (mutações);
 - 10 (b) contatar a referida biblioteca variada de TCRs com AAGIGILTV-HLA-A*0201 em condições adequadas para permitir a ligação dos TCRs ao AAGIGILTV-HLA-A*0201; e
 - (c) medir o K_D da interação.

FIG 1a

10 20
* *
M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R

30 40 50
* * *
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E

60 70 80
* * *
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T

90 100 110
* * *
Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 1)

FIG 1b

10 20
* *
M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
30 40 50
* * *
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
60 70 80
* * *
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
90 100 110
* * *
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L

(SEQ ID No: 2)

FIG 2a

atgcaaaaagaagttgaacaaaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcacttacagtga
ccgaggttcccagtccttcttctgttacagacaatattctgggaaaagccctgagtgataatgttcataactccaatggtgac
aaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtgatgtttctctgctcatcagagactcccagcccagtg
attcagccacctacctctgtgccgtgaacgttcaggcaaatcaacctttggggatgggactacgctcactgtgaagccaaat
atccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagctgtctgcctattcaccgatttggat
tctcaaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttc
aagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgacttgcattgtgcaaacgccttcaacaacgacattattccagaag
acaccttcttccccagcccagaaagttcctaagcttga
(SEQ ID No: 3)

FIG 2b

atgtctcagactattcatcaatggccagcgaccctgggtgcagcctgtgggcagcccgtctctctggagtgcaactgtggagg
gaacatcaaaccccaacctatactggtaccgacaggctgcaggcaggggcctccagctgctcttactccgttggatttgg
ccagatcagctctgaggtgccccagaatctctcagcctccagaccccaggaccggcagttcatcctgagttctaagaagctc
ctcctcagtgactctggcttctatctgtgtcctgggtccgagacaggggttaggcaccggggagctgttttttgagaaggctct
aggctgaccgtactggaggacctgaaaaacgtgttccacccgaggtcgtgtgtttagccatcagaagcagagatctcc
cacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggtttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgg
gaaggaggtgcacagtgggggtcagcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgc
tctgagcagccgcctgaggggtctggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgg
gctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccgctacccagatcgtcagcgccgaggcctggggtag
agcagactaagcttga
(SEQ ID No: 4)

FIG 3a

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A
W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
S

(SEQ ID No: 5)

FIG 3b

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D
P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID No: 6)

FIG 4a

tatacatatgcaaaaagaagttgaacaaaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcactta
cagtgaccgaggttcccagtccttcttctgtacagacaataattctgggaaaagccctgagttgataatgttcataactccaat
ggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctcatcagagactcccagc
ccagtgattcagccacctacctctgtgccgtgaacgttgaggcaaatcaacctttggggatgggactacgctcactgtgaa
gccaaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagctctgtcgcctattcacc
gattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaggtgcttagacatgaggtctat
ggacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattc
cagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctaagcttga
(SEQ ID No: 7)

FIG 4b

tatacatatgtctcagactattcatcaatggccagcgacctggtgcagcctgtgggcagcccgcctctctctggagtgcactgt
ggaggggaacatcaaaccccaacctatactggtaccgacaggctgcaggcaggggcctccagctgctcttctactccgttgg
tattggccagatcagctctgaggtgccccagaatctctcagcctccagaccccaggaccggcagttcatcctgagttctaag
aagctcctcctcagtgactctggcttctatctctgtgcctggtccgagacagggtaggcaccggggagctgtttttggagaa
ggctctaggctgaccgtactggaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagag
atctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggtttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtg
aatgggaaggaggtgcacagtggggtctgacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagat
acgctctgagcagccgctgagggctctggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttct
acgggctctcggagaatgacgagtgagccaggtatgggcaaaccggtcaccagatcgtcagcgccgagggcctggg
gtagagcagactaagcttga
(SEQ ID No: 8)

FIG 5a

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
 P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
 Q S K D S D V Y I T D K  V L D M R S M D F K S N S A V A
 W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
 S

(SEQ ID No: 9)

FIG 5b

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V  T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID No: 10)

FIG 6

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N D G G R L T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID No: 11)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V G G R L T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID No: 12)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N D A G R L T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID No: 13)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N D G G K L T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID No: 14)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N D G G R S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID No: 15)

FIG 6 (Cont.)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I I F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V G G Y L L F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 16)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N P G G V L T F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 17)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N P G G L L T F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 18)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N S G N H M T F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 19)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N L S P G L T F G D G T T L T V K P

(SEQ ID No: 20)

FIG 6 (Cont.)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N V G V I L R F G D G T T L T V K P
(SEQ ID No: 21)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N N G M P S T F G D G T T L T V K P
(SEQ ID No: 22)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N V G L I L L F G D G T T L T V K P
(SEQ ID No: 23)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N S E R P R T F G D G T T L T V K P
(SEQ ID No: 24)

FIG 7a

N I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T
D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K
(SEQ ID No: 25)

FIG 7b

E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID No: 26)

FIG 7c

E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID No: 27)

FIG 8a

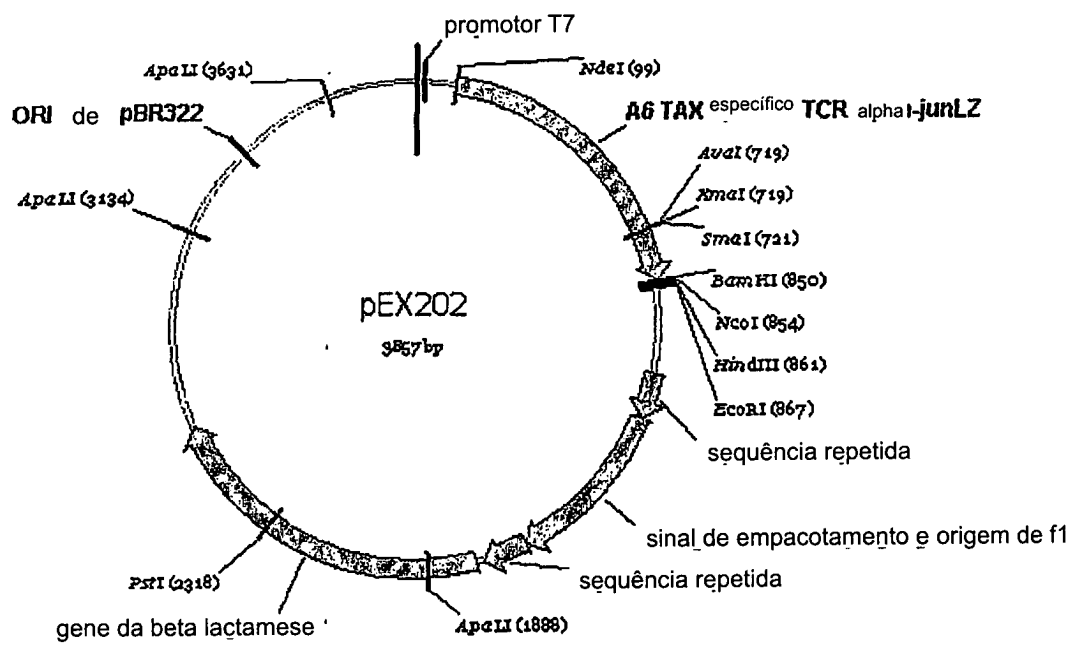


FIG 8b

gatctcgatccgcgaaattaatacgaactcactatagggagaccacaacggttccctctagaataattttgttaactttaaga
aggagatatacatatgcagaaggaagtgaggcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccattgcctctctcaa
ctgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttctctgttacagacaatatctgggaaaagccctgagtgataatgtccata
tactccaatggtgacaaaagaagatggaaggttacagcacagctcaataaagccagccagtgatgttctctgctcatcagaga
ctcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaactgacagctgggggaaattgcagtttgagcagggacc
caggttgtgtcaccacagataccagaacctgacctgcccgtgtaccagctgagagactctaatccagtgacaagctgtg
tctgcctattcaccgattttgattctcaaaacaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgcta
gacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttca
acaacagcatttattccagaagacaccttctcccagcccagaaaagtccccgggggtagaatgcccggtggaggaa
aaagtgaacaccttgaaagctcagaactcggagctggcgtccacggccaacatgctcagggaacaggtggcacagcttaa
acagaaagtcatgaactactaggaatccatgtaagcttgaattccgatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgag
ttggctgtgtccaccgctgagcaataactagcataaccttggggcctctaaacgggtctgaggggtttttgtgaaagg
aggaactatatccggataatcttgaagacgaaaggcctcgtgatacgcctatttttataggtaatgtcatgataataatggtt
tcttagacgtcaggtggcacttttggggaaatgtgcgcggaaccttatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccg
ctcatgagacaataacctgataaatgttcaataatatttgttaaaattcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaacca
ataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggtgttccagtttgaacaaga
gtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaacct
caccctaatcaagtttttggggtcaggtgtccgttaaagcactaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagcttg
acgggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagggaagggaagaaagcgaaggagcgggcgctagggcgctggcaag
tgtagcgggtcacgtgtgcgtgaaccaccacacccgcccgttaatgcgccgtacagggcgcgctcaggtggcacttttcg
gggaaatgtgcgcggaaccttattgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaat
gcttcaataatattgaaaagggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcggcattttgccttcc
gtttttgctcaccagaaacgtgtgtgaaagtaaaagatgtgtgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatgaactgg
atctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaaagtctgctatgtgg
cgcggtattatcccgtgttgacggcggaagagcaactcggctcggcgatacactattctcagaatgacttggttgagtact
caccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacctagtgataaac
tgccggcaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaact
cgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggc
aacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggaata
aagttgcaggaccacttctgcgtcggcccttccggctggctgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtct
cgcggtatcattgcagcactggggcagatgtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaact
atggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgttaactgtcagaccaagttaactcatat
atactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcccttttgataatctcatgacaaaatcccttaa
cgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcccttttttgcgcgtaactgt
ctgcttgcaacaaaaaaaccacgctaccagcgggtgtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaa
ctggcttcagcagagcgcagataccaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca
ccgctacataacctcgtctgtataatcctgttaccagtggctgtgtccagtggcgataagtctgtgttaccgggttggaactca
agacgatagttaccggataaggcgagcgggtcgggtgtaacgggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacg
acctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgaaaagcggcagcttccgaaggggagaaggcgagacaggt
atccggtgaagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacgaggggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcct

FIG 8b (Cont.)

gtcgggttcgccacctctgactgagcgtcgatttttgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagca
acgcggcccttttacggctcctggccttttgcaggcctttgctcacatgttttctgcgttatcccctgattctgttgataaccgt
attaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgaggaagcgg
aagagcgcctgatgcgggtattttctccttacgcctctgtgcgggtatttcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgctct
gatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacac
ccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgt
gtcagagggtttcacccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcag
(SEQ ID NO: 28)

FIG 9a

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N D G G R L T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
Q S K D S D V Y I T D K V L D M R S M D F K S N S A V A
W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
S

(SEQ ID NO: 29)

FIG 9b

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V T D
P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
T Q I V S A E A W G R A D P G A P T S S S T K K T Q L Q L
E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K
F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L
A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T
T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S
T L T

(SEQ ID NO: 30)

FIG 10

WT MEL MTCR ligado ao WT HLA-A2 9mer

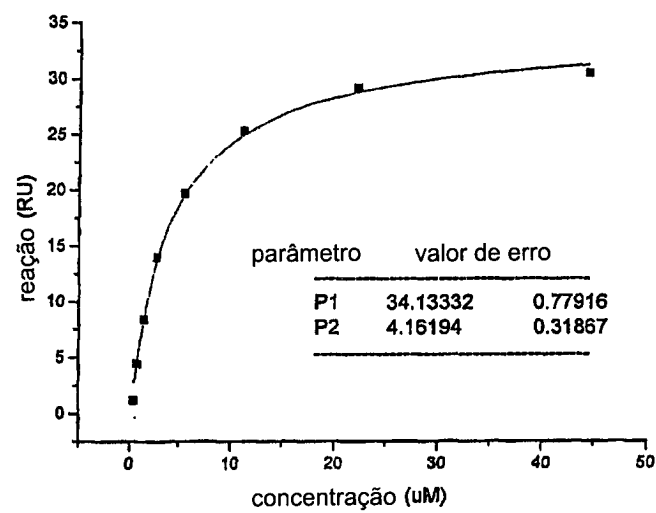


FIG 11a

ctcgagccgccaccatgatgaagagcctgcgggtgctgctggatcctgtggctgcagctgagctgggtgtggagccag
 cagaaggagggtggagcagaacagcgccccctgagcgtgcccaggggccatcgcagcctgaactgcacctacag
 cgaccggggcagccagagcttcttctggtatcggcagtagcagcggaagagccccgagctgattatgttcatctacagcaa
 cggcgacaaggaggacggccggttcaccgcccagctgaacaaggccagccagtatgtgagcctgctgatccgggacag
 ccagcccagcgacagcgccacctacctgtgcgccgtgaacgtggctgggaagagcaccttcggcgacggcaccaccct
 gaccgtgaagcccaacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgcgggacagcaagagcagcgacaagtctgt
 gtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaatgtgagccagagcaaggacagcgacgtgtacatcaccgacaagacc
 gtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggagcaacaagagcgacttcgctgcgcca
 acgcctcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagccccgagagcagctgcgacgtgaaactggaggag
 aagagcttcgagaccgacaccaacctgaactccagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctgaaagtggct
 ggggtcaacctgctgatgacctgcgggtgtggagcagctaaacgcgt
 (SEQ ID NO: 31)

FIG 11b

MEL wt alpha protein sequence

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY
 RQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCVNVVA
 GKSTFGDGTTLTVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY
 ITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNSII PEDTFFPSP ESSCDVKLVE
 KSFETDTNLFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
 (SEQ ID NO: 32)

FIG 12a

ctcgagccgccaccatgatgaagagcctgcgggtgctgctggtgatcctgtggctgcagctgagctgggtgtggagccag
 cagaaggaggtggagcagaacagcgccccctgagcgtgcccaggggcgccatcgccagcctgaactgcacctacag
 cgaccggggcagccagagcttcttctgtatcggcagtacagcggcaagagccccgagctgattatgtcatctacagaa
 cggcgacaaggaggacggccggttcaccgcccagctgaacaaggccagccagtatgtgagcctgctgatccgggacag
 ccagcccagcgacagcgccacctacctgtgcgccgtgaacgacggcgccagactgaccttcggcgacggcaccacct
 gaccgtgaagcccaacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgcgggacagcaagagcagcgacaagtctgt
 gtgctgttcaccgacttcgacagccagaccaatgtgagccagagcaaggacagcgacgtgtacatcaccgacaagacc
 gtgctggacatgcggagcatggactcaagagcaacagcgccgtggcctggagcaacaagagcgacttcgctgcgcca
 acgcttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagccccgagagcagctgcgacgtgaaactgggtggag
 aagagcttcgagaccgacaccaacctgaactccagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctgaaagtggct
 ggggtcaacctgctgatgacctgcgggtgtggagcagctaaacgcgt
 (SEQ ID NO: 33)

FIG 12b

MEL c1 alpha protein sequence

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY
 RQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNDG
 GRLTFGDGTTLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVY
 ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVE
 KSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
 (SEQ ID NO: 34)

FIG 13a

ctcgagccgccaccatgatgaagagcctgcgggtgctgctggtgatcctgtggctgcagctgagctgggtgtggagccag
cagaaggagggtggagcagaacagcggccccctgagcgtgcccagggcgccatcggcagcctgaactgcacctacag
cgaccggggcagccagagcttcttcgtatcggcagtacagcggcaagagccccgagctgattatgtcatctacagcaa
cggcgacaaggaggacggccggttcaccgcccagctgaacaaggccagccagtatgtgagcctgctgatccgggacag
ccagcccagcgacagcggcacctacctgtgcgctgaacgacggcggcagaagcaccttcggcgacggcaccacct
gaccgtgaagcccaacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgcgggacagcaagagcagcgacaagtctgt
gtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaatgtgagccagagcaaggacagcgacgtgtacatcaccgacaagacc
gtgctggacatgcggagcatggactcaagagcaacagcgccgtggcctggagcaacaagagcgacttcgctgcgcca
acgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagccccgagagcagctgcgacgtgaaactggtggag
aagagcttcgagaccgacaccaacctgaacttcagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctgaaagtggct
gggttcaacctgctgatgacctgcggctgtggagcagctaaacgcgt
(SEQ ID NO: 35)

FIG 13b

MEL5 c1d alpha protein sequence

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY
RQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLI RDSQPSDSATYLCVNDG
GRSTFGDGTTLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVY
ITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNSII PEDTFFPSP ESSCDVKLVE
KSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
(SEQ ID NO: 36)

FIG 14a

ctcgagccgccaccatgatgaagagcctgcgggtgctgctggatcctgtggctgcagctgagctgggtgtggagccag
 cagaaggaggtggagcagaacagcggccccctgagcgtgcccagggcgccatcgccagcctgaactgcacctacag
 cgaccggggcagccagagcttcttctgtatcggcagtagcggcaagagccccgagctgattatgtcatctacagcaa
 cggcgacaaggaggacggccggttcaccgcccagctgaacaaggccagccagtatgtgagcctgctgatccgggacag
 ccagcccagcgacagcgccacctacctgtgcgccgtgaacgtgggcctgacctgctgttcggcgacggcaccacctga
 ccgtgaagcccaacatccagaacccccgaccccgccgtgtaccagctgcgggacagcaagagcagcgacaagtctgtgtg
 cctgttcaccgacttcgacagccagaccaatgtgagccagagcaaggacagcgacgtgtacatcacgacaagaccgtgc
 tggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggagcaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgc
 ctcaacaacagcatcatccccgaggacacctttttcccgagcccgagagcagctgcgacgtgaaactggtggagaaga
 gcttcgagaccgacaccaacctgaactccagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctgaaagtggctgggtt
 caacctgctgatgacctgcggctgtggagcagctaaacgct
 (SEQ ID NO: 37)

FIG 14b

MEL5 c9 alpha protein sequence

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY
 RQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLI RDSQPSDSATYLCVAVNG
 LILLFGDGTTLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVY
 ITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVE
 KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
 (SEQ ID NO: 38)

FIG 15a

ggatccgcccaccatgctgtgcagcctgctggccctgctgctgggcaccttctcggagtgcggagccagaccatccac
 cagtggccccccacactggtgcagcctgtgggcagccccctgagcctggagtgcaccgtggaggggcaccagcaacccc
 aacctgtactggtatcggcaggccgcagggaggggggtgcagctgctgttctactctgtgggcacatcgccagatcagcag
 cgagggtgccccagaacctgagcgcctccaggccccaggaccggcagttcatcctgagcagcaagaagctgctgctgagc
 gacagcggttctacctgtgcgcctggagcgagaccggcctgggcaccggcgagctgttctcggcgagggtccaggc
 tgaccgtgctggaggacctgaagaacgtgttccccccgagggtggcgtgttcgagcccagcgaggccgagatcagcca
 caccagaaggctaccctggtgtgtctggccaccggcttctaccccgaccacgtggagctgtcctggtgggtgaacggca
 aggaggtgcacagcggcggtgtctaccgacccccagcccctgaaggagcagcccgcctgaacgacagccggtactgcc
 tgtcctccagactgagagtgcgcacacctctggcagaacccccggaaccacttcgggtgccagggtgcagttctacggcc
 tgagcgagaacgacgagtgaggaccaggaccgggccaagcccgtgaccagattgtgagcgccaggcctggggcaga
 gccgactgcggcttcaccagcgagagctaccagcagggcggtgctgagcggccaccatcctgtacgagatcctgctgggca
 aggccacctgtacgccgtgctggtgtctgccctggtgctgatggctatggtgaagcggaaggacagccggggctaagcg
 gccgc

(SEQ ID NO: 39)

FIG 15b

MEL5 WT beta protein sequence

MLCSLLALLLGTFFGVRSQTIHQWPATLVQPVGSPLSLECTVEGTSNPNLYWYRQAAG
 RGLQLLFYSVGIGQISSEVPQNLASRPQDRQFILSSKKLLLSDSGFYLCWSETGLG
 TGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL
 SWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY
 GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY
 AVLVSALVLMAMVKRKDSRG

(SEQ ID NO: 40)

FIG 16

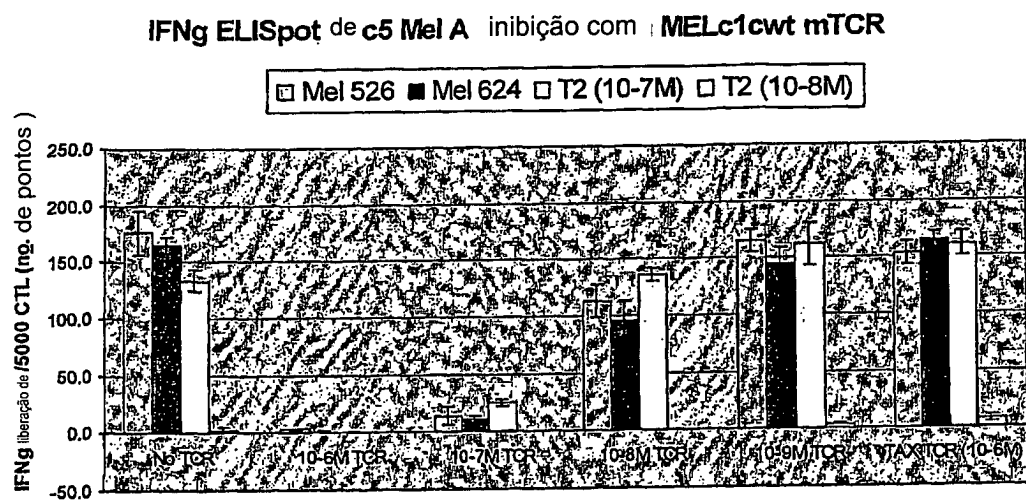


FIG 17a

atgatgaaatccttgagagttttactagtatcctgtggcttcagttgagctgggttgagccaacagaaggaggtggagca
gaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttctt
ctggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgttcataataccaatggtgacaaagaagatggaaggtttac
agcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtg
ccgtgaacgttgaggcaaatcaaccttggggatgggactacgtcacgtgaagccaaatatccagaacctgacctg
ccgtgtaccagctgagagactctaatccagtgacaagctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcaca
aagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtgg
cctggagcaacaaatctgacttgcagtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagccca
gaaagtctctgtgatgtcaagctggtcgagaaaagcttgaacagatacgaacctaaacttcaaaacctgtcagtgattgg
gttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgtcgcggtgtgtccagc
(SEQ ID NO: 44)

FIG 17b

atgctctgctctccttgccttctcctgggcactttcttggggtcagatctcagactattcatcaatggccagcgacctggt
gcagcctgtgggcagcccgtctctctgagtgactgtggagggaacatcaaaccccaacctatactggtaccgacagg
ctgcaggcaggggctccagctgcttctactccgttggtattggccagatcagctctgaggtgccccagaatctctcagcc
tccagaccccaggaccggcagttcatcctgagttctaagaagctcctcctcagtgactctggcttctatctctgtgcctggcc
gagacagggttaggcaccggggagctgttttggagaaggctctaggctgaccgtactggaggacctgaaaaacgtgttc
ccacccgaggtcgtgtgttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccac
aggcttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagacccg
cagccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgagggctcggccacctctg
gcagaacccccgaaccacttccgtgtcaagtccagttctacgggctctcgagaatgacgagtgagccaggtatagg
ccaaacctgtcaccagatcgtcagccgagggcctgggtagagcagactgtggcttcacctccgagcttaccagcaa
ggggtcctgtctgccaccatccttatgagatcttgctaggggaaggccacctgtatgccgtgctgtcagtgccctcgtgct
gatggccatggtcaagagaaaggattccagagggc
(SEQ ID NO: 45)

FIG 18

atgatgaaatccttgagagttttactagtgatcctgtggcttcagttgagctgggttggagccaacagaaggaggtggagca
gaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcacttacagtaccgaggttcccagtccttctt
ctggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgttcataactccaatgggtgacaaagaagatggaaggtttac
agcacagctcaataaagccagccagtaigtgtctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtg
ccgtgaacgatgggggtcgtcttaccttggggatgggactacgctcactgtgaagccaaatatccagaacctgacctgc
cgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcaca
agtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagcaacagtgctgtggc
ctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccag
aaagttcctgtgatgtcaagctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaacttcaaaacctgtcagtgattgggt
tccgaatcctcctctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgctgcggctgtggtccagc
(SEQ ID NO: 46)

FIG 19a

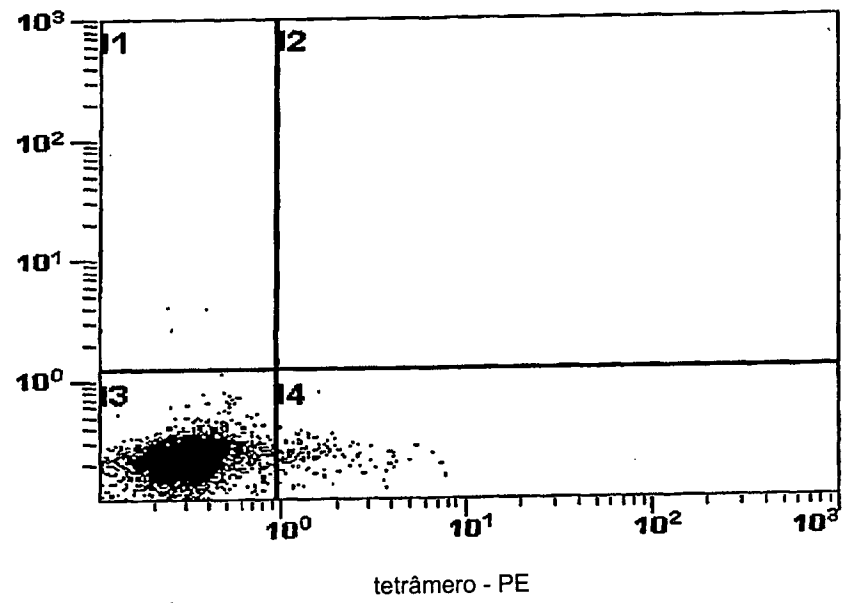


FIG 19b

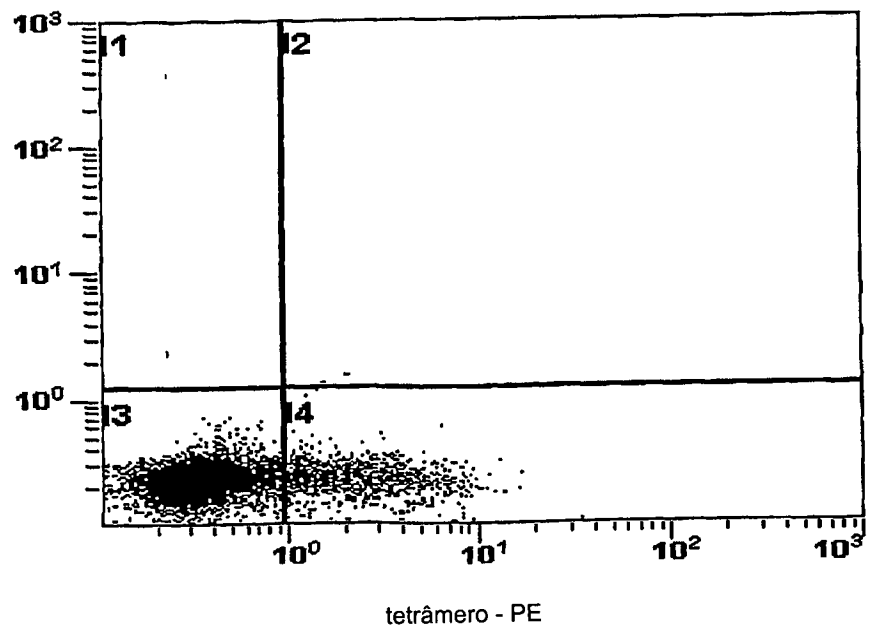


FIG 20

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S F Q
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 47)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S F L
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 48)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S Y Q
 G A Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 49)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S S I
 H A Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 50)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S N L
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 51)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D F
 G A Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
 (SEQ ID NO: 52)

FIG 20 (Cont.)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F T Y R E G D K E
D G R F T A Q L N K A S Q H V S L L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P
(SEQ ID NO: 53)

FIG 21

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y Y G P F G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 54)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y F G P F G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 55)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y F G P Y G Q I S
S E A P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 56)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y W G P F G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 57)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G M G G W Q F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 58)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L G M G G W S F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 59)

FIG 21(Cont.)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G M G G W A F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 60)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G V G G W D F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 61)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G V G G W E F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 62)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F V L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L N T S G W F F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 63)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L N T N G W F F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 64)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L N L G G W F F G E G S R L T V L
 (SEQ ID NO: 65)

FIG 21 (Cont.)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L N V S G W F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 66)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
G F Y L C A W S E T G L N T T G W F F G E G S R L T V L
(SEQ ID NO: 67)

FIG 22

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S F Q
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
 P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
 Q S K D S D V Y I T D K Q V L D M R S M D F K S N S A V A
 W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
 S

(SEQ ID NO: 68)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S F L
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
 P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
 Q S K D S D V Y I T D K Q V L D M R S M D F K S N S A V A
 W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
 S

(SEQ ID NO: 69)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
 G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F T Y R E G D K E
 D G R F T A Q L N K A S Q H V S L L I R D S Q P S D S A T
 Y L C A V N V A G K S T F G D G T T L T V K P N I Q N P D
 P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S
 Q S K D S D V Y I T D K Q V L D M R S M D F K S N S A V A
 W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S
 S

(SEQ ID NO: 70)

FIG 23

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y Y G P F G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID NO: 71)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y F G P F G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID NO: 72)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y F G P Y G Q I S
 S E A P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID NO: 73)

FIG 23 (Cont.)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G P Q L L F Y W G P F G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G T G E L F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V G T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID NO: 74)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G M G G W Q F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V G T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID NO: 75)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L G V G G W E F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V G T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID NO: 76)

FIG 23 (Cont.)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L N L G G W F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID NO: 77)

M S Q T I H Q W P A T L V Q P V G S P L S L E C T V E G T
 S N P N L Y W Y R Q A A G R G L Q L L F Y S V G I G Q I S
 S E V P Q N L S A S R P Q D R Q F I L S S K K L L L S D S
 G F Y L C A W S E T G L N V S G W F F G E G S R L T V L E
 D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V
 C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D
 P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q
 D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V
 T Q I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID NO: 78)

RESUMO

Patente de Invenção: **"RECEPTORES DE CÉLULAS T MELANO-A DE ALTA AFINIDADE"**.

5 A presente invenção fornece TCRs com uma afinidade (K_D) menor ou igual a 3 μM , e/ou uma taxa de separação (k_{off}) de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ou mais baixa, para o complexo AAGIGILTV-HLA-A*0201. Estes TCRs são úteis, seja isolados ou associados com um agente terapêutico, para atacar células cancerosas presentes nesse complexo.