

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 507**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2016** **PCT/GB2016/053653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17089771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2016** **E 16805189 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3380115**

54 Título: **Péptidos de PIWIL1**

30 Prioridad:

23.11.2015 GB 201520546

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

20.06.2024

73 Titular/es:

IMMUNOCORE LIMITED (100.0%)
101 Park Drive, Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB

72 Inventor/es:

POWLESLAND, ALEX;
POPA, ALINA y
CHESTER, FIONA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 973 507 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de PIWIL1

La presente invención se refiere a nuevos péptidos derivados de la proteína 1 similar a piwi ("piwi-like protein 1", PIWIL1), a complejos que comprenden dichos péptidos unidos a moléculas del MHC recombinantes, y a células que presentan dicho péptido en complejo con moléculas del MHC. La presente invención también proporciona restos de unión que se unen a los péptidos y/o complejos de la invención. Tales moléculas son útiles para el desarrollo de reactivos inmunoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer.

Los linfocitos T son una parte crucial de la rama celular del sistema inmunitario. Reconocen específicamente fragmentos peptídicos derivados de proteínas intracelulares y presentados en complejo con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad ("Major Histocompatibility Complex", MHC) en la superficie de células presentadoras de antígenos ("antigen presenting cells", APC). En los seres humanos, las moléculas del MHC se conocen como antígenos leucocitarios humanos ("human leukocyte antigens", HLA), y ambos términos se utilizan en el presente documento como sinónimos. Las moléculas del MHC tienen un surco de unión en el que se unen los fragmentos peptídicos. El reconocimiento de determinados antígenos de péptido-MHC está mediado por el correspondiente receptor de linfocitos T ("T cell receptor", TCR). Las células tumorales expresan diversos antígenos asociados a tumores ("tumour associated antigens", TAA) y los péptidos derivados de estos antígenos pueden presentarse en la superficie de las células tumorales. La detección de un péptido derivado de un TAA presentado por una MHC de clase I por parte de un linfocito T CD8+ portador del correspondiente receptor de linfocitos T conduce a la destrucción selectiva de la célula tumoral. Sin embargo, como consecuencia de los procesos de selección que tienen lugar durante la maduración de los linfocitos T en el timo, existe una escasez de linfocitos T (y de TCR) en el repertorio circulante, que reconozcan los péptidos derivados de TAA con un nivel suficientemente alto de afinidad. Por lo tanto, las células tumorales a menudo escapan a la detección.

La identificación de péptidos concretos derivados de TAA presentados por moléculas del MHC sobre células tumorales permite el desarrollo de nuevos reactivos inmunoterapéuticos diseñados para atacar y destruir específicamente dichas células tumorales. Dichos reactivos pueden ser moléculas que se unen al péptido derivado de TAA y/o a complejos de péptido y MHC, y normalmente actúan induciendo una respuesta de linfocitos T. Por ejemplo, dichos reactivos pueden basarse, exclusiva o parcialmente, en linfocitos T, en receptores de linfocitos T ("T cell receptors", TCR) o en anticuerpos. La identificación de los TAA adecuados para el tratamiento terapéutico dirigido requiere un análisis cuidadoso con el fin de mitigar la toxicidad inespecífica del tumor en un entorno clínico. Los TAA adecuados como dianas para la intervención inmunoterapéutica deben presentar una diferencia suficiente en los niveles de expresión entre el tejido tumoral y los tejidos sanos normales; en otras palabras, debe existir una ventana terapéutica adecuada, que permita dirigirse al tejido tumoral y minimizar la afectación de los tejidos sanos. Idealmente, los TAA se expresan en gran medida en el tejido tumoral y tienen una expresión limitada o nula en el tejido sano normal. Normalmente, un experto en la materia utilizaría datos de expresión de proteínas para identificar si existe una ventana terapéutica para un TAA determinado. Una mayor expresión de la proteína es indicativa de mayores niveles de péptido presentado por MHC en la superficie celular. Los inventores de la presente solicitud han descubierto que las diferencias en la expresión de ARN, en lugar de la expresión de proteínas, son indicadores más fiables de los niveles de pMHC y, en consecuencia, de la ventana terapéutica.

Por lo tanto, es deseable proporcionar péptidos derivados de TAA con una ventana terapéutica adecuada, basada en la expresión de ARN, complejos con MHC de los mismos y restos de unión que puedan utilizarse para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Además, es deseable que dichos péptidos no sean idénticos ni muy similares a cualquier otro péptido restringido por el MHC, no se deriven de una o más proteínas alternativas y no sean presentados por el MHC en la superficie de células no cancerosas. La existencia de estos péptidos imitadores aumenta el riesgo de toxicidad *in vivo* de las terapias dirigidas contra el cáncer.

Están disponibles algoritmos informáticos, tales como SYFPETHEL (Rammensee, *et al.*, Immunogenetics, noviembre de 1999, 50(3-4):21321-9 (acceso a través de www.syfpeithi.de) y BIMAS (Parker, *et al.*, J. Immunol., 1 de enero de 1994, 152(1):163-175 (acceso a través de http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) para predecir las secuencias de aminoácidos de péptidos presentados por el MHC derivados de proteínas. Sin embargo, se sabe que estos procedimientos generan una elevada proporción de falsos positivos (ya que se limitan a definir la probabilidad de que un péptido determinado pueda unirse a un MHC determinado y no tienen en cuenta el procesamiento intracelular). Por lo tanto, no es posible predecir con exactitud si las células tumorales presentan realmente un determinado péptido-MHC. Normalmente se necesitan datos experimentales directos.

PIWIL1 (también conocida como protein 1 similar a piwi o HIWI y con número de registro Uniprot Q96J94) está asociada a la división meiótica y desempeña un papel fundamental durante la espermatogénesis. Se ha descrito la expresión de PIWIL1 en diversos tumores, mientras que la expresión en tejidos normales se limita a los testículos (He *et al.*, BMC Cancer, 8 de diciembre de 2009, 9:426; Grochola *et al.*, Br. J. Cancer, 7 de octubre de 2008, 99(7):1083-1088; Taubert *et al.*, Oncogene, 15 de febrero de 2007, 26(7):1098-1100; Li *et al.*, Oncol. Rep., abril de 2010, 23(4):1063-1068; Zeng *et al.*, Chin. Med. J. (inglés), julio de 2011, 124(14):2144-2149; documento WO2000032039). PIWIL1 es una diana ideal para aplicaciones inmunoterapéuticas. Los inventores han descubierto que PIWIL1 tiene una ventana terapéutica especialmente adecuada basada en la expresión del ARN. Los inventores han descubierto

nuevos péptidos derivados de PIWIL1 que son presentados en la superficie celular en complejo con el MHC. Estos péptidos son especialmente útiles para el desarrollo de reactivos que puedan dirigirse a las células que expresan PIWIL1 y para el tratamiento de cánceres, incluidos los de colon y esófago.

- 5 En un primer aspecto, la invención proporciona un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, en el que el péptido forma un complejo con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Los inventores han descubierto que los péptidos de la invención son presentados por el MHC en la superficie de las células tumorales. En consecuencia, los péptidos de la invención, así como los restos que se unen a los complejos de péptido-MHC, pueden utilizarse para desarrollar reactivos terapéuticos.

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
1	SLSNRLYYL
3	SLIQNLFKV
5	SIAGFVASI

10

Como es sabido en la técnica, la capacidad de un péptido para formar un complejo inmunogénico con un tipo de MHC determinado y activar así los linfocitos T, viene determinada por la estabilidad y la afinidad de la interacción del péptido y el MHC (van der Burg *et al.*, J. Immunol., 1 de mayo de 1996, 156(9):3308-3314). La persona experta puede, por ejemplo, determinar si un péptido determinado forma o no un complejo con una molécula del MHC determinando si el MHC se puede volver a plegar en presencia del péptido utilizando el proceso expuesto en el ejemplo 2. Si el péptido no forma un complejo con el MHC, éste no se replegará. El replegamiento suele confirmarse utilizando un anticuerpo que reconoce el MHC únicamente en estado plegado. Se encontrará más información en Garboczi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 15 de abril de 1992, 89(8):3429-3433. Como alternativa, el experto puede determinar la capacidad de un péptido para estabilizar el MHC sobre la superficie de líneas celulares deficientes en TAP, tales como las células T2, u otros procedimientos biofísicos para determinar los parámetros de interacción (Harndahl *et al.*, J. Biomol. Screen, febrero de 2009, 14(2):173-180).

15

20

Los péptidos de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17 y los complejos que comprenden estos péptidos no entran en el alcance de la invención.

En el presente documento se describen péptidos que comprenden, consisten fundamentalmente o consisten en:

25

1. (a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17, o
2. (b) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17 con la excepción de 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 inserciones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 deleciones de aminoácidos,

en los que el péptido forma un complejo con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
2	GSEVSFLEY
4	LKIMNLQQI
6	GSEVSFLEY
7	TRGAPLISV
8	LTSRPQWALY
9	NPRLTVIVV
10	EVDDRTEAY

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
11	KMGGELWRV
12	AIATKIAL
13	IDYNPLMEAR
14	SFDSNLLSF (A24)
15	RLQQKVTEV
16	MLIPELCYL
17	IMIEVDDRTEA

También se divulgan en el presente documento péptidos que comprenden o consisten fundamentalmente en:

(a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, o

(b) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5 con la excepción de 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 inserciones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 deleciones de aminoácidos,

en los que el péptido forma un complejo con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

Preferentemente, los péptidos divulgados en el presente documento tienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 aminoácidos de longitud, y lo más preferentemente tienen 8, 9 o 10 u 11 aminoácidos de longitud, lo más preferentemente tienen 9 aminoácidos de longitud.

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden comprender o consistir fundamentalmente en las secuencias de aminoácidos proporcionadas en SEQ ID NO: 1, 3 y 5.

Los residuos de aminoácidos que comprenden los péptidos de la invención pueden modificarse químicamente. Entre los ejemplos de modificaciones químicas se incluyen las correspondientes a modificaciones postraduccionales, por ejemplo, fosforilación, acetilación y desamidación (Engelhard *et al.*, Curr. Opin. Immunol., febrero de 2006, 18(1):92-17). Las modificaciones químicas pueden no corresponder a las que pueden estar presentes *in vivo*. Por ejemplo, los extremos N o C terminales del péptido pueden modificarse para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos (véase, por ejemplo, Brinckerhoff *et al.*, Int. J. Cancer, 29 de octubre de 1999, 83(3):326-334). Otros ejemplos de modificaciones no naturales incluyen la incorporación de aminoácidos reticulantes fotorreactivos, aminoácidos N-metilados, reducción del esqueleto, retroinversión mediante el uso de D-aminoácidos, metilación N-terminal y amidación C-terminal y pegilación. Algunos ejemplos de modificaciones no naturales que no están dentro del alcance de la invención incluyen la incorporación de α -aminoácidos y β -aminoácidos no codificados.

La sustitución de aminoácidos significa que un residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido de reemplazo en la misma posición. Los residuos de aminoácidos insertados pueden insertarse en cualquier posición y pueden insertarse de manera que algunos o todos los residuos de aminoácidos insertados sean inmediatamente adyacentes entre sí o pueden insertarse de manera que ninguno de los residuos de aminoácidos insertados sea inmediatamente adyacente a otro residuo de aminoácido insertado. Pueden deleccionarse uno, dos o tres aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17. Cada deleción puede tener lugar en cualquier posición de los SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17.

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden comprender uno, dos o tres aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal y/o en el extremo N-terminal de la secuencia de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17. Un péptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17 con la excepción de una sustitución de aminoácido y una inserción de aminoácido, una sustitución de aminoácido y una deleción de aminoácido, o una inserción de aminoácido y una deleción de aminoácido. Un péptido divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 y 6-17, con la excepción de una sustitución de aminoácido, una inserción de aminoácido y una deleción de aminoácido.

Los aminoácidos insertados y los aminoácidos que se han introducido por sustitución pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales y, por ejemplo, pueden contener una cadena lateral no natural y/o estar unidos mediante enlaces peptídicos no naturales. Dichos ligandos peptídicos alterados se analizan con más detalle en Douat-Casassus *et al.*, J. Med. Chem., 5 de abril de 2007, 50(7):1598-1609 y Hoppes *et al.*, J. Immunol., 15 de noviembre

de 2014, 193(10):4803-4813 y las referencias allí citadas). Si se sustituye y/o inserta más de un residuo de aminoácido, los residuos de aminoácido sustituidos/insertados pueden ser iguales entre sí o diferentes entre sí. Cada aminoácido que se ha introducido por sustitución puede tener una cadena lateral diferente a la del aminoácido que ha sido sustituido.

5 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras, lo que significa que el aminoácido sustituido tiene propiedades químicas similares a las del aminoácido original. Una persona experta entenderá qué aminoácidos comparten propiedades químicas similares. Por ejemplo, los siguientes grupos de aminoácidos comparten propiedades químicas similares, tales como el tamaño, la carga y la polaridad: Grupo 1: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly; Grupo 2: Asp, Asn, Glu, Gln; Grupo 3: His, Arg, Lys; Grupo 4: Met, Leu, Ile, Val, Cys; Grupo 5: Phe, Thy, Trp.

10 Preferentemente, los polipéptidos de la invención se unen al MHC en el surco de unión al péptido de la molécula del MHC. Por lo general, las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente no alterarán la capacidad del péptido para unirse al MHC. Las modificaciones de aminoácidos pueden mejorar preferentemente la capacidad del péptido para unirse al MHC. Por ejemplo, pueden realizarse mutaciones en las posiciones que anclan el péptido al MHC. Tales posiciones de anclaje y los residuos preferidos en estas ubicaciones son conocidos en la técnica, en concreto para los
15 péptidos que se unen a HLA-A*02 (véase, por ejemplo, Parkhurst *et al.*, J. Immunol., 15 de septiembre de 1996, 157(6):2539-2548; y Parker *et al.*, J. Immunol., 1 de diciembre de 1992, 149(11):3580-3587). Los residuos de aminoácidos en la posición 2 y en el extremo C terminal del péptido se consideran posiciones de anclaje primarias. Los residuos de anclaje preferidos pueden ser diferentes para cada tipo de HLA. Los aminoácidos preferidos en la posición 2 para HLA-A*02 son Leu, Ile, Val o Met. En el extremo C terminal, se prefiere una valina o una leucina.

20 Un péptido de la invención puede utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria. Si este es el caso, es importante que la respuesta inmunitaria sea específica para la diana prevista, a fin de evitar el riesgo de efectos secundarios no deseados que puedan estar asociados con una respuesta inmunitaria "inespecífica". Por lo tanto, se prefiere que la secuencia de aminoácidos de un péptido de la invención no coincida con la secuencia de aminoácidos de un péptido de cualquier otra proteínas o proteínas, en especial, la de otra proteína humana. Un experto en la materia entenderá
25 cómo buscar en una base de datos de secuencias de proteínas conocidas para determinar si un péptido según la invención está presente en otra proteína.

Los péptidos de la invención pueden conjugarse con restos adicionales, tales como moléculas portadoras o adyuvantes para su uso como vacunas (para ejemplos específicos, véase Liu *et al.*, Bioconjug. Chem., 20 de mayo de 2015, 26(5): 791-801 y las referencias allí citadas). Los péptidos pueden estar biotinilados o incluir un marcador, tal
30 como un marcador His. Algunos ejemplos de adyuvantes utilizados en vacunas contra el cáncer incluyen microbios, tales como la bacteria del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y/o sustancias producidas por bacterias, tales como Detox B (una emulsión en gotas de aceite de monofosforil lípido A y un esqueleto de pared celular micobacteriano). La KLH ("keyhole limpet hemocyanin", hemocianina de lapa californiana) y la seroalbúmina bovina son ejemplos de proteínas portadoras adecuadas utilizadas en composiciones vacunales. Como alternativa o además, el péptido puede unirse, covalentemente o de otro modo, a proteínas, tales como moléculas del MHC y/o anticuerpos (por ejemplo, véase King
35 *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., junio de 2013, 62(6):1093-1105). Como alternativa o además, los péptidos pueden encapsularse en liposomas (por ejemplo, véase Adamina *et al.*, Br. J. Cancer, 12 de enero de 2004, 90(1):263-269). Estos péptidos modificados pueden no corresponder a ninguna molécula que exista en la naturaleza.

Los péptidos de la invención pueden sintetizarse con facilidad mediante síntesis de Merrifield, también conocida como
40 síntesis en fase sólida, o cualquier otra metodología de síntesis peptídica. El péptido de calidad analítica GMP es producido mediante técnicas de síntesis en fase sólida por Multiple Peptide Systems, San Diego, CA. Los péptidos pueden inmovilizarse, por ejemplo, sobre un soporte sólido, tal como una esfera. Como alternativa, el péptido puede producirse de modo recombinante, si así se desea, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos suelen implicar el uso de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el
45 péptido a expresar, para expresar el péptido *in vivo*; por ejemplo, en bacterias, levaduras, células de insectos o de mamífero. Como alternativa, pueden utilizarse sistemas *in vitro* sin células. Tales sistemas son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Life Technologies, Paisley, Reino Unido. Los péptidos pueden aislarse y/o suministrarse en forma sustancialmente pura. Por ejemplo, pueden suministrarse en una forma sustancialmente exenta de otros péptidos o proteínas.

50 En un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo del péptido del primer aspecto y una molécula del MHC. Preferentemente, el péptido se une al surco de unión al péptido de la molécula del MHC. La molécula del MHC puede ser de MHC de clase I. La molécula del MHC de clase I puede seleccionarse entre HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A24, HLA-B*07, HLA-B*08, HLA-B40, HLA-B44, HLA-B15, HLA-C*04, HLA-C*03 HLA-C*07. Como es sabido por los expertos en la materia, existen variantes alélicas de los tipos de HLA mencionados, todas las
55 cuales están incluidas en la presente invención. Se puede encontrar una lista completa de alelos HLA en la base de datos de polimorfismos inmunitarios EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html>; Robinson *et al.*, Nucleic Acids Research (2015), 43:D423-431). La molécula del MHC puede ser HLA-A*02.

60 El complejo de la invención puede estar aislado y/o en una forma sustancialmente pura. Por ejemplo, el complejo puede suministrarse en una forma sustancialmente exenta de otros péptidos o proteínas. Cabe señalar que, en el contexto de la presente invención, la expresión "molécula del MHC" incluye moléculas del MHC recombinantes,

moléculas del MHC no naturales y fragmentos funcionalmente equivalentes del MHC, incluidos sus derivados o variantes, siempre que se mantenga la unión al péptido. Por ejemplo, las moléculas del MHC pueden estar fusionadas a un resto terapéutico, estar unidas a un soporte sólido, estar en forma soluble, estar unidas a un marcador, estar biotiniladas y/o estar en forma multimérica. El péptido puede unirse covalentemente al MHC.

- 5 Los procedimientos para producir moléculas del MHC recombinantes solubles con las que los péptidos de la invención pueden formar un complejo son conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen, entre otros, la expresión y purificación a partir de células de *E. coli* o células de insecto. En el ejemplo 2 se presenta un procedimiento adecuado. Como alternativa, las moléculas del MHC pueden producirse sintéticamente, o utilizando sistemas sin células.
- 10 Los péptidos y/o complejos de polipéptido-MHC de la invención pueden asociarse (covalentemente o de otro modo) con un resto capaz de provocar un efecto terapéutico. Dicho resto puede ser una proteína portadora de conocida inmunogenicidad. La KLH (hemocianina de lapa californiana) y la seroalbúmina bovina son ejemplos de proteínas portadoras adecuadas utilizadas en composiciones vacunales. Como alternativa, los péptidos y/o complejos de péptido-MHC de la invención pueden asociarse con un compañero de fusión. Los compañeros de fusión pueden utilizarse con fines de detección, o para unir dicho péptido o MHC a un soporte sólido, o para la oligomerización del MHC. Los complejos de MHC pueden incorporar un sitio de biotinilación al que se puede añadir biotina, por ejemplo, utilizando la enzima BirA (O'Callaghan *et al.*, 1 de enero de 1999, 266(1):9-15). Otros compañeros de fusión adecuados incluyen, entre otros, marcadores fluorescentes o luminiscentes, radiomarcadores, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste, anticuerpos o enzimas que producen un producto detectable. Los procedimientos de detección pueden incluir la citometría de flujo, la microscopía, la electroforesis o el recuento por centelleo. Los compañeros de fusión pueden incluir citocinas, tales como la interleucina 2, el interferón alfa y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

- 25 Los complejos de péptido-MHC de la invención pueden suministrarse en forma soluble o pueden inmovilizarse mediante su unión a un soporte sólido adecuado. Algunos ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, una esfera, una membrana, Sepharose, una esfera magnética, una placa, un tubo, una columna. Los complejos de péptido-MHC pueden fijarse a una placa ELISA, a una esfera magnética o a un chip biosensor de resonancia de plasmón de superficie. Los procedimientos de fijación de los complejos de péptido-MHC a un soporte sólido son conocidos por el experto, e incluyen, por ejemplo, el uso de una pareja de unión por afinidad, por ejemplo, biotina y estreptavidina, o anticuerpos y antígenos. Los complejos de péptido-MHC pueden marcarse preferentemente con biotina y fijarse a superficies recubiertas de estreptavidina.

- 30 Los complejos de péptido-MHC de la invención pueden estar en forma multimérica, por ejemplo, dimérica, tetramérica, pentamérica u octomérica, o mayor. Algunos ejemplos de procedimientos adecuados para la producción de complejos de péptido-MHC multiméricos se describen en Greten *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol., marzo de 2002, 9(2):216-220 y las referencias allí citadas. En general, los multiméricos de péptido-MHC pueden producirse utilizando péptido-MHC marcado con un residuo de biotina y que forma un complejo a través de estreptavidina marcada con fluorescencia. Como alternativa, pueden formarse complejos multiméricos de péptido-MHC utilizando inmunoglobulina como andamiaje molecular. En este sistema, los dominios extracelulares de las moléculas del MHC se fusionan con la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina separada por un conector corto de aminoácidos. También se han producido multiméricos de péptido-MHC utilizando moléculas portadoras, tales como el dextrano (documento WO02072631). Los complejos de péptido-MHC multiméricos pueden ser útiles para mejorar la detección de restos de unión, tales como receptores de linfocitos T, que se unen a dicho complejo, debido a los efectos de avidéz.

- 45 Los péptidos de la invención pueden presentarse en la superficie de una célula en complejo con el MHC. Así, la invención también proporciona una célula que presenta en su superficie un complejo de la invención. Dicha célula puede ser una célula de mamífero, preferentemente una célula del sistema inmunitario y, en concreto, una célula especializada en la presentación de antígenos, tal como una célula dendrítica o un linfocito B. Otras células preferidas son las células T2 (Hosken, *et al.*, Science, 20 de abril de 1990, 248(4953):367-370). Las células que presentan el péptido o el complejo de la invención pueden aislarse, preferentemente en forma de población, o proporcionarse en una forma sustancialmente pura. Dichas células pueden no presentar de forma natural el complejo de la invención o, como alternativa, dichas células pueden presentar el complejo en mayor cantidad superior a la que presentarían en la naturaleza. Tales células pueden obtenerse pulsando dichas células con el péptido de la invención. La pulsación consiste en incubar las células con el péptido durante varias horas utilizando concentraciones de péptido que suelen oscilar entre 10^{-5} y 10^{-12} M. Dichas células pueden transducirse además con moléculas HLA, tales como HLA-A*02, para inducir aún más la presentación del péptido. Las células pueden producirse de forma recombinante. Las células que presentan péptidos de la invención pueden utilizarse para aislar linfocitos T y receptores de linfocitos T (TCR) que son activados por dichas células o se unen a las mismas, como se describe con más detalle a continuación.

- 60 En un tercer aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido del primer aspecto de la invención. El ácido nucleico puede ser ADNc. La molécula de ácido nucleico puede consistir fundamentalmente en una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido del primer aspecto de la invención o puede codificar únicamente el péptido de la invención, es decir, no codificar ningún otro péptido.

Dicha molécula de ácido nucleico puede sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Debido a la degeneración del código genético, un experto en la materia apreciará que las moléculas de ácido nucleico con diferente secuencia de nucleótidos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos.

5 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según el tercer aspecto de la invención. El vector puede incluir, además de una secuencia de ácido nucleico que codifica únicamente un péptido de la invención, una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican uno o más péptidos adicionales. Dichos péptidos adicionales, una vez expresados, pueden fusionarse al N-terminal o al C-terminal del péptido de la invención. El vector puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifique un marcador peptídico o de proteína, tal como, por ejemplo, un sitio de biotilación, un marcador FLAG, un marcador MYC, un
10 marcador HA, un marcador GST, un marcador Strep o un marcador de polihistidina.

Los vectores adecuados son conocidos en la técnica, al igual que la construcción de vectores, incluida la selección de promotores y otros elementos reguladores, tales como elementos potenciadores. El vector utilizado en el contexto de la presente invención comprende deseablemente secuencias adecuadas para su introducción en células. Por ejemplo, el vector puede ser un vector de expresión, un vector en el que la secuencia codificante del péptido está bajo el control
15 de sus propios elementos reguladores de acción en cis, un vector diseñado para facilitar la integración o la sustitución de genes en células hospedadoras y similares.

En el contexto de la presente invención, el término "vector" engloba una molécula de ADN, tal como un plásmido, un bacteriófago, un fagómido, un virus u otro vehículo, que contiene una o más secuencias de nucleótidos heterólogas o recombinantes (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente, bajo el control de
20 un promotor funcional y, potencialmente, también un potenciador) y es capaz de actuar como un vector en el sentido entendido por los expertos en la materia. Los fagos y vectores virales adecuados incluyen, entre otros, el bacteriófago lambda (X), el bacteriófago EMBL, el virus de simio 40, el virus del papiloma bovino, el virus de Epstein-Barr, el adenovirus, el virus del herpes, el virus vaccinia, el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino, el lentivirus y el virus del sarcoma de Rous.

25 En un quinto aspecto, la invención proporciona una célula que comprende el vector del cuarto aspecto de la invención. La célula puede ser una célula presentadora de antígenos y es preferentemente una célula del sistema inmunitario. En concreto, la célula puede ser una célula especializada en la presentación de antígenos, tal como una célula dendrítica o un linfocito B. La célula puede ser una célula de mamífero.

Los péptidos y los complejos de la invención pueden utilizarse para identificar y/o aislar restos de unión que se unen específicamente al péptido y/o al complejo de la invención. Dichos restos de unión pueden utilizarse como reactivos
30 inmunoterapéuticos y pueden incluir anticuerpos y TCR.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un resto de unión que une el péptido de la invención cuando dicho péptido está en complejo con el MHC, en el que el resto de unión es un receptor de linfocitos T (TCR) o un anticuerpo. El resto de unión puede unirse parcialmente al MHC, siempre que también se una al péptido. El resto de unión puede
35 unirse sólo al péptido, y esa unión puede ser específica. El resto de unión puede unirse únicamente al complejo de péptido-MHC y esa unión puede ser específica.

Cuando se utiliza con referencia a los restos de unión que se unen al complejo de la invención, "específico" se utiliza generalmente en el presente documento para referirse a la situación en la que el resto de unión no muestra ninguna unión significativa a uno o más complejos de péptido-MHC alternativos distintos del complejo de péptido-MHC de la
40 invención. Los TCR que se unen a uno o varios, y en concreto a varios antígenos presentados por células que no son la diana prevista del TCR plantean un mayor riesgo de toxicidad cuando se administran *in vivo* debido a la posible reactividad inespecífica. Estos TCR de alta reactividad cruzada no son adecuados para un uso terapéutico.

El resto de unión puede ser un receptor de linfocitos T (TCR). Los TCR se describen utilizando la nomenclatura TCR de International Immunogenetics (IMGT) y enlaces a la base de datos pública de secuencias de TCR de IMGT. Las
45 secuencias distintivas definidas por la nomenclatura IMGT son ampliamente conocidas y accesibles para quienes trabajan en el campo de los TCR. Por ejemplo, pueden encontrarse en "T cell Receptor Factsbook" (2001), LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8; LeFranc (2011), Cold Spring Harb. Protoc., 2011(6): 595-603; LeFranc (2001), Curr. Protoc. Immunol., apéndice 1: apéndice 10; LeFranc (2003), Leukemia, 17(1): 260-266y en la página web del IMGT (www.IMGT.org)

50 Los TCR de la invención pueden estar en cualquier formato conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los TCR pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ u homodímeros $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$.

Los TCR heterodímeros alfa-beta tienen una cadena alfa y una cadena beta. A grandes rasgos, cada cadena comprende una región variable, una región de unión y una región constante, y la cadena beta también suele contener una breve región de diversidad entre las regiones variable y de unión, pero esta región de diversidad suele
55 considerarse parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR ("Complementarity Determining Regions", regiones determinantes de la complementariedad) hipervariables insertadas en una secuencia marco; se cree que la CDR3 es el principal mediador del reconocimiento del antígeno. Existen varios tipos de regiones variables

de cadena alfa ($V\alpha$) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su marco, las secuencias de CDR1 y CDR2, y por una secuencia de CDR3 parcialmente definida.

Los TCR de la invención pueden no corresponder a los TCR tal como existen en la naturaleza. Por ejemplo, pueden comprender combinaciones de cadenas alfa y beta que no están presentes en un repertorio natural. Como alternativa o además, pueden ser solubles y/o el dominio constante de la cadena alfa y/o beta puede estar truncado con respecto a las secuencias de TRAC/TRBC nativas/naturales de manera que, por ejemplo, el dominio transmembrana C terminal y las regiones intracelulares no estén presentes. Este truncamiento puede provocar la eliminación de los residuos de cisteína de TRAC/TRBC que forman el enlace disulfuro nativo intercatenario.

Además, los dominios TRAC/TRBC pueden contener modificaciones. Por ejemplo, la secuencia extracelular de la cadena alfa puede incluir una modificación con respecto a TRAC nativo/natural por la que el aminoácido T48 del TRAC, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C48. Asimismo, la secuencia extracelular de la cadena beta puede incluir una modificación con respecto a TRBC1 o TRBC2 nativo/natural por la que S57 de TRBC1 o TRBC2, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C57. Estas sustituciones de cisteína con respecto a las secuencias extracelulares nativas de las cadenas alfa y beta permiten la formación de un enlace disulfuro no nativo intercatenario que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado replegando las cadenas extracelulares alfa y beta (documento WO 03/020763). Este enlace disulfuro no nativo facilita la presentación de los TCR correctamente plegados sobre los fagos (Li *et al.*, Nat. Biotechnol., marzo de 2005, 23(3):349-354). Además, el uso del TCR soluble estable unido por disulfuro permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y de la semivida de unión. Se describen posiciones alternativas para la formación de un enlace disulfuro no nativo en el documento WO 03/020763. Entre ellas se incluyen Thr 45 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 77 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Tyr 10 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 17 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Thr 45 del exón 1 de TRAC*01 y Asp 59 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; y Ser 15 del exón 1 de TRAC*01 y Glu 15 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01. Los TCR con un enlace disulfuro no nativo pueden ser de longitud completa o pueden estar truncados.

Los TCR de la invención pueden estar en formato monocatenario (como los descritos en el documento WO9918129). Los TCR monocatenarios incluyen polipéptidos de TCR $\alpha\beta$ del tipo $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$, $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β o $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$ -C β , opcionalmente en la orientación inversa, en los que $V\alpha$ y $V\beta$ son regiones variables α y β de TCR, respectivamente, C α y C β son regiones constantes α y β de TCR, respectivamente, y L es una secuencia conectora. Los TCR monocatenarios pueden contener un enlace disulfuro no nativo. El TCR puede estar en una forma soluble (es decir, sin dominios transmembrana o citoplásmicos), o puede contener cadenas alfa y beta de longitud completa. El TCR puede estar en la superficie de una célula, tal como un linfocito T.

Los TCR de la invención pueden diseñarse para incluir mutaciones. Los procedimientos para producir variantes mutadas de TCR de alta afinidad, tales como la presentación por fagos y la mutagénesis específica dirigida al sitio, son conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase el documento WO 04/044004, y Li *et al.*, Nat. Biotechnol., marzo de 2005, 23(3):349-354). Preferentemente, las mutaciones para mejorar la afinidad se realizan dentro de las regiones variables de las cadenas alfa y/o beta. Más preferentemente, las mutaciones para mejorar la afinidad se realizan dentro de las CDR. Puede haber entre 1 y 15 mutaciones en las regiones variables de las cadenas alfa y/o beta.

Los TCR de la invención también pueden marcarse con un compuesto de obtención de imágenes, por ejemplo, un marcador adecuado para fines de diagnóstico. Dichos TCR de alta afinidad marcados son útiles en un procedimiento para detectar un ligando de TCR seleccionado entre complejos de CD1-antígeno, superantígenos bacterianos y complejos de MHC-péptido/superantígeno, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto el ligando de TCR con un TCR de alta afinidad (o un complejo de TCR multimérico de alta afinidad) que sea específico para el ligando de TCR; y detectar la unión al ligando de TCR. En complejos de TCR multiméricos de alta afinidad como los descritos en Zhu *et al.*, J. Immunol., 1 de marzo de 2006, 176(5):3223-3232 (formado, por ejemplo, utilizando heterodímeros biotinilados), puede utilizarse estreptavidina fluorescente (disponible en el mercado) para proporcionar un marcador detectable. Un multímero marcado con fluorescencia es adecuado para su uso en el análisis FACS, por ejemplo, para detectar células presentadoras de antígenos portadoras del péptido para el que el TCR de alta afinidad es específico.

Un TCR de la presente invención (o un complejo multivalente del mismo), como alternativa o además, puede asociarse (por ejemplo, covalentemente o unirse de otro modo) con un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un resto tóxico para su uso en la destrucción de células, o un agente inmunoestimulante, tal como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR multivalente de alta afinidad de la presente invención puede tener una capacidad de unión mejorada para un ligando TCR en comparación con un heterodímero de receptor de linfocitos T no multimérico de tipo salvaje o de alta afinidad. Así, los complejos de TCR multivalentes de alta afinidad según la invención son especialmente útiles para rastrear o dirigirse a células que presentan antígenos concretos *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermedios para la producción de otros complejos de TCR multivalentes de alta afinidad que tengan tales usos. Por lo tanto, el TCR de alta afinidad o el complejo de TCR multivalente de alta afinidad pueden proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para su uso *in vivo*.

Los TCR de alta afinidad de la invención pueden utilizarse en la producción de reactivos biespecíficos solubles. Un reactivo que comprende un TCR soluble puede preferentemente fusionarse mediante un conector a un fragmento de

anticuerpo específico anti-CD3. En el documento WO 10/133828 se describe más detalles, incluido cómo producir dichos reactivos.

La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el TCR de la invención, un vector de expresión de TCR que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, así como una célula que porta dicho vector.

5 El TCR puede codificarse en un único marco de lectura abierto o en dos marcos de lectura abiertos distintos. También se incluye en el alcance de la invención una célula que porta un primer vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena alfa de un TCR de la invención, y un segundo vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena beta de un TCR de la invención. Como alternativa, un vector puede codificar una cadena alfa y una cadena beta de un TCR de la invención.

10 La invención también proporciona una célula que presenta en su superficie un TCR de la invención. La célula puede ser un linfocito T u otra célula inmunitaria. El linfocito T puede modificarse de forma que no se corresponda con un linfocito T tal como existe en la naturaleza. Por ejemplo, el linfocito puede transfectarse con un vector que codifique un TCR de la invención, de tal manera que el linfocito T exprese otro TCR además del TCR nativo. Además o como alternativa, el linfocito T puede modificarse de forma que no sea capaz de presentar el TCR nativo. Existen varios procedimientos adecuados para la transfección de linfocitos T con ADN o ARN que codifican los TCR de la invención (véase, por ejemplo, Robbins *et al.*, J. Immunol., 1 de mayo de 2008, 180(9):6116-3331). Los linfocitos T que expresan los TCR de la invención son adecuados para su uso en el tratamiento basado en terapia adoptiva de enfermedades como el cáncer. Como sabrán los expertos en la materia, existen varios procedimientos adecuados para llevar a cabo la terapia adoptiva (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, Nat. Rev. Cancer, abril de 2008, 8(4):299-308).

20 Los TCR de la invención destinados a ser utilizados en terapia adoptiva están generalmente glucosilados cuando son expresados por los linfocitos T transfectados. Como es bien sabido, el patrón de glucosilación de los TCR transfectados puede verse modificado por mutaciones del gen transfectado (Kuball J. *et al.*, J. Exp. Med., 16 de febrero de 2009, 206(2):463-475).

25 En las figuras se proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de la región variable del TCR capaces de reconocer específicamente los péptidos de la invención. También se contemplan en la invención TCR que tengan un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con las secuencias proporcionadas. Los TCR con el mismo uso de cadenas alfa y beta también se incluyen en la invención.

El resto de unión de la invención puede ser un anticuerpo. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sean naturales o producidas parcial o totalmente de forma sintética. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluido cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético, y cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea un dominio de unión a anticuerpo o que sea homólogo con el mismo. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en el documento EP-A-0120694 y en el documento EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tiene las regiones variables de un anticuerpo no humano, por ejemplo, murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los procedimientos para fabricar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5225539. Algunos ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno, tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede denominarse en el presente documento "mab".

45 Es posible tomar un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, y utilizar la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente (véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400). Un hibridoma (u otra célula que produzca anticuerpos) puede estar sujeto a mutaciones genéticas u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unirse a antígenos. Algunos ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que está formado por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que está formado por los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que está formado por los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature, 12 de octubre de 1989, 341(6242):544-546) que está formado por un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas de Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird *et al.*, Science, 21 de octubre de 1988, 242(4877):423-426; Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, agosto de 1988, 85(16):5879-5783); (viii) dímeros de Fv monocatenarios

biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica (documento WO94/13804; P. Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 15 de julio de 1993, 90(14):6444-6448). Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, y cada polipéptido comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, y los dos dominios están unidos (por ejemplo, por un conector peptídico), pero no pueden asociarse entre sí para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento WO94/13804). Cuando se vayan a utilizar anticuerpos biespecíficos, puede tratarse de anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diversas maneras (Hollinger y Winter, Curr. Opin. Biotechnol., agosto de 1993, 4(4):446-449), por ejemplo, pueden prepararse de modo químico o a partir de hibridomas, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Puede ser preferible utilizar diacuerpos o dímeros de scFv en lugar de anticuerpos enteros. Los diacuerpos y los scFv pueden construirse sin región Fc, utilizando únicamente dominios variables, lo que reduce potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica. Otras formas de anticuerpos biespecíficos incluyen los "Janusins" monocatenarios descritos en Traunecker *et al.*, EMBO J., diciembre de 1991, 10(12):3655-3659). Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como los fragmentos de anticuerpos) con las especificidades de unión adecuadas pueden seleccionarse fácilmente mediante la presentación por fagos (documento WO94/13804) a partir de bancos. Si uno de los brazos del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces puede prepararse un banco en el que se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad adecuada. Un "dominio de unión al antígeno" es la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente a un antígeno y es complementaria a una parte o a la totalidad del mismo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte concreta del antígeno, que se denomina epítipo. Uno o más dominios variables de anticuerpo pueden proporcionar un dominio de unión al antígeno. Un dominio de unión al antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El resto de unión puede ser una molécula similar a un anticuerpo que ha sido diseñada para unirse específicamente a un complejo de péptido-MHC de la invención. Se prefieren especialmente los anticuerpos que imitan el TCR, tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO2007143104 y Sergeeva *et al.*, Blood, 21 de abril de 2011, 117(16):4262-4272 y/o Dahan y Reiter, Expert. Rev. Mol. Med., 24 de febrero de 2012, 14:e6.

También se divulgan en el presente documento restos de unión basados en andamiajes proteínicos diseñados. Los andamiajes proteínicos se derivan de estructuras proteínicas naturales, solubles y estables que han sido modificadas para proporcionar un sitio de unión a una molécula diana de interés. Entre los ejemplos de andamiajes proteínicos artificiales se incluyen, entre otros, las aficuerpos, que se basan en el dominio Z de la proteína A estafilocócica que proporciona una interfaz de unión en dos de sus hélices a (Nygren, FEBS J., junio de 2008, 275(11):2668-2676); anticalinas, derivadas de lipocalinas, que incorporan sitios de unión para ligandos pequeños en el extremo abierto de un pliegue de barril beta (Skerra, FEBS J., junio de 2008, 275(11):2677-2683), nanocuerpos y DARPin. Los andamiajes proteínicos diseñados suelen estar dirigidos a unirse a las mismas proteínas antigénicas que los anticuerpos y son potenciales agentes terapéuticos. Pueden actuar como inhibidores o antagonistas o como vehículos de transporte para dirigir moléculas, tales como toxinas, a un tejido específico *in vivo* (Gebauer y Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., junio de 2009, 13(3):245-155). También pueden utilizarse péptidos cortos para unirse a una proteína diana. Los filómeros son péptidos naturales estructurados derivados de genomas bacterianos. Estos péptidos representan una amplia gama de pliegues estructurales de proteínas y pueden utilizarse para inhibir/interrumpir las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Watt, Nat. Biotechnol., febrero de 2006, 24(2):177-183).

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un péptido de la invención, un complejo de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención o un resto de unión de la invención para su uso en medicina. El péptido, el complejo, el ácido nucleico, el vector, la célula o el resto de unión pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención del cáncer, en concreto de mama, colon y esófago

En un octavo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención, un complejo de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención o un resto de unión de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta composición farmacéutica puede presentarse en cualquier forma adecuada (en función del procedimiento deseado de administración al paciente). Puede suministrarse en forma farmacéutica unitaria, generalmente se suministrará en un envase sellado y puede suministrarse como parte de un kit. Normalmente (aunque no necesariamente), un kit de este tipo incluye instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias. Las composiciones y procedimientos de administración adecuados son conocidos por los expertos en la materia; véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, Blood, 16 de julio de 2009, 114(3):535-546 con referencia a los números de ensayo clínico NCI-07-C-0175 y NCI-07-C-0174. Las células según la invención se suministrarán normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, pueden proporcionarse linfocitos T transfectados con TCR de la invención

en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una crema, una emulsión, un gel, un liposoma, una nanopartícula o una pomada.

La composición farmacéutica puede adaptarse para su administración por cualquier vía adecuada, tal como la vía parenteral (incluida subcutánea, intramuscular o intravenosa), entérica (incluida oral o rectal), inhalatoria o intranasal. Dichas composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con el vehículo o vehículos o el excipiente o excipientes en condiciones estériles.

Las dosis de las sustancias de la presente invención pueden variar entre límites amplios, en función de la enfermedad o el trastorno a tratar (tal como cáncer, infección vírica o enfermedad autoinmunitaria), la edad y el estado del individuo a tratar, etc. Por ejemplo, un intervalo de dosis adecuado para un reactivo que comprende un TCR soluble fusionado a un dominio anti-CD3 puede estar comprendido entre 25 ng/kg y 50 µg/kg. Un médico determinará en última instancia las dosis adecuadas que deben utilizarse.

El péptido de la invención puede proporcionarse en forma de una composición de vacuna. La composición de la vacuna puede ser útil para el tratamiento o la prevención del cáncer. La presente invención abarca todas estas composiciones. Como se apreciará, las vacunas pueden adoptar diversas formas (Schlom, J. Natl. Cancer Inst., 18 de abril de 2012, 104(8):599-3613). Por ejemplo, el péptido de la invención puede utilizarse directamente para inmunizar a pacientes (Salgaller, Cancer Res., 15 de octubre de 1996, 56(20):4749-4757, y Marchand, Int. J. Cancer, 18 de enero de 1999, 80(2):219-2630). La composición de la vacuna puede incluir otros péptidos, de forma que el péptido de la invención sea uno de una mezcla de péptidos. Pueden añadirse adyuvantes a la composición de la vacuna para aumentar la respuesta inmunitaria

Como alternativa, la composición de la vacuna puede adoptar la forma de una célula presentadora de antígenos que muestre el péptido de la invención en complejo con MHC. Preferentemente, la célula presentadora de antígenos es una célula inmunitaria, más preferentemente una célula dendrítica. El péptido puede pulsarse sobre la superficie de la célula (Thurner, J. Exp. Med., 6 de diciembre de 1999, 190(11):1669-1678), o el ácido nucleico que codifica el péptido de la invención puede introducirse en células dendríticas (por ejemplo, por electroporación, Van Tendeloo, Blood, 1 de julio de 2001, 98(1):49-64456).

Los péptidos, los complejos, las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las células y los restos de unión de la invención pueden ser de origen no natural y/o purificados y/o diseñados y/o recombinantes y/o aislados y/o sintéticos.

En un noveno aspecto, la invención proporciona un procedimiento para identificar un resto de unión que se une a un complejo de la invención, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un resto de unión candidato con el complejo y determinar si el resto de unión candidato se une al complejo, en el que el resto de unión es un TCR o un anticuerpo. Los procedimientos para determinar la unión a complejos de péptido-MHC son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos preferidos incluyen, entre otros, la resonancia de plasmón de superficie o cualquier otra técnica de biosensores, ELISA, citometría de flujo, cromatografía, microscopía. Como alternativa o además, la unión puede determinarse mediante ensayos funcionales en los que se detecta una respuesta biológica tras la unión, por ejemplo, la liberación de citocinas o la apoptosis celular.

El resto de unión candidato puede ser un resto de unión del tipo ya descrito, tal como un TCR o un anticuerpo. Dicho resto de unión puede obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los linfocitos T de unión al antígeno y los TCR se han aislado tradicionalmente de sangre fresca obtenida de pacientes o donantes sanos. Dicho procedimiento consiste en estimular los linfocitos T utilizando DC autólogas, seguidas de linfocitos B autólogos, pulsados con el péptido de la invención. Pueden realizarse varias rondas de estimulación, por ejemplo, tres o cuatro. A continuación, puede comprobarse la especificidad de los linfocitos T activados midiendo la liberación de citocinas en presencia de células T2 pulsadas con el péptido de la invención (por ejemplo, utilizando un ensayo IFNγ ELISpot). A continuación, las células activadas pueden clasificarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia ("fluorescence-activated cell sorting", FACS) utilizando anticuerpos marcados para detectar la producción intracelular de citocinas (por ejemplo, IFNγ) o la expresión de un marcador de la superficie celular (tal como CD137). Las células seleccionadas pueden expandirse y seguir validándose, por ejemplo, mediante un ensayo ELISpot y/o citotoxicidad contra las células diana y/o tinción con el tetramero de péptido-MHC. A continuación, las cadenas de TCR de los clones validados pueden amplificarse mediante amplificación rápida de extremos de ADNc ("rapid amplification of cDNA ends", RACE) y secuenciarse.

Como alternativa, los TCR y los anticuerpos pueden obtenerse a partir de bancos de visualización en los que el complejo de péptido y MHC de la invención se utiliza para barrer el banco. La producción de bancos de anticuerpos mediante presentación por fagos es bien conocida en la técnica, por ejemplo, véase Aitken, Antibody phage display: Methods and Protocols (2009, Humana, Nueva York). Los TCR pueden presentarse sobre la superficie de partículas de fagos y partículas de levadura, por ejemplo, y tales bancos se han utilizado para el aislamiento de variantes de alta afinidad de TCR derivadas de clones de linfocitos T (tal como se describe en el documento WO04044004, y Li *et al.*, Nat. Biotechnol., marzo de 2005, 23(3):349-354, y el documento WO9936569). Más recientemente se ha demostrado que los bancos de fagos de TCR pueden utilizarse para aislar TCR con una especificidad antigénica novedosa. Estos bancos suelen construirse con secuencias de cadenas alfa y beta correspondientes a las que se encuentran en un repertorio natural. Sin embargo, la combinación aleatoria de estas secuencias de cadenas alfa y beta, que se produce

durante la creación del banco, produce un repertorio de TCR que no está presente en la naturaleza (como se describe en los documentos WO2015/136072, WO2017046198, WO2017046201 WO2017046202 WO2017046205, WO2017046207, WO2017046208, WO2017046211 y WO2017046212).

- 5 El complejo de péptido-MHC de la invención puede utilizarse preferentemente para cribar un banco de diversos TCR presentados en la superficie de partículas de fagos. Los TCR presentados por dicho banco pueden no corresponder a los contenidos en un repertorio natural, por ejemplo, pueden contener apareamientos de cadenas alfa y beta que no estarían presentes *in vivo* y/o los TCR pueden contener mutaciones no naturales y/o los TCR pueden estar en forma soluble. El cribado puede incluir el barrido del banco de fagos con complejos de péptido-MHC de la invención y el posterior aislamiento de los fagos unidos. Para ello, los complejos de péptido-MHC pueden fijarse a un soporte sólido, tal como una esfera magnética, o a una matriz de columna, y aislar los complejos de péptido-MHC unidos a fagos, con un imán o por cromatografía, respectivamente. Las etapas de barrido pueden repetirse varias veces, por ejemplo, tres o cuatro veces. Los fagos aislados pueden seguir expandiéndose en células de *E. coli*. Las partículas de fagos aisladas pueden someterse a pruebas para determinar la unión específica de los complejos de péptido-MHC de la invención.
- 10 La unión puede detectarse mediante técnicas que incluyen, entre otras, ELISA o SPR, por ejemplo, utilizando un instrumento BiaCore. La secuencia de ADN del receptor de linfocitos T presentado por el fago que se une al péptido-MHC puede identificarse mediante procedimientos PCR convencionales.
- 15

Las características preferidas u opcionales de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*.

- 20 La presente invención se ilustrará con más detalle en los siguientes ejemplos y figuras, que se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no pretenden limitar la invención en modo alguno.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 17 muestran los respectivos espectros de fragmentación para los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 17, eluidos de las células. Debajo de cada espectro se muestra una tabla con los iones correspondientes.

- 25 La figura 18(A-C) muestra placas ELISA que demuestran la especificidad de los TCR por un complejo del péptido de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, respectivamente, y HLA-A*02, comparando la unión con otros complejos de péptido-HLA-A*02.

La figura 19 muestra las secuencias de aminoácidos de las respectivas cadenas variables alfa y beta de los TCR de la figura 18(A-C).

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de péptidos derivados de la diana mediante espectrometría de masas

La presentación de péptidos con restricción por HLA derivados de PIWIL1 en la superficie de líneas celulares tumorales se investigó mediante espectrometría de masas.

Procedimiento

- 35 Las líneas celulares inmortalizadas obtenidas de fuentes comerciales se mantuvieron y expandieron en condiciones convencionales.

Los complejos de HLA de clase I se purificaron por inmunoafinidad utilizando anticuerpos anti-HLA disponibles en el mercado BB7.1 (anti-HLA-B*07), BB7.2 (anti-HLA-A*02) y W6/32 (anticlase 1). Brevemente, las células se lisaron en tampón que contenía detergente no iónico NP-40 (al 0,5 % v/v) a 5×10^7 células por ml y se incubaron a 4 °C durante 1 h con agitación/mezcla. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se limpió previamente con proteína A-Sepharose. El sobrenadante se hizo pasar sobre 5 ml de resina que contenía 8 mg de anticuerpo anti-HLA inmovilizado sobre un andamiaje de proteína A-Sepharose. Las columnas se lavaron con tampones de baja y alta salinidad y los complejos se eluyeron en ácido. Los péptidos eluidos se separaron de los complejos de HLA mediante cromatografía en fase inversa utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (Phenomenex). El material unido se eluyó de la columna y se redujo su volumen utilizando una centrifugadora de vacío.

- 40 Los péptidos se separaron por cromatografía líquida de alta presión ("high pressure liquid chromatography", HPLC) en un sistema Dionex Ultimate 3000 utilizando una columna C18 (Phenomenex). Los péptidos se cargaron en tampón A al 98 % (ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1 %) y tampón B al 2 % (TFA al 0,1 % en acetonitrilo). Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente escalonado de B (del 2-60 %) durante 20 minutos. Las fracciones se recogieron a intervalos de un minuto y se liofilizaron.
- 50

Los péptidos se analizaron mediante nanoLCMS/MS utilizando un nanoLC Dionex Ultimate 3000 acoplado a espectrómetros de masas AB Sciex Triple TOF 5600 o Thermo Orbitrap Fusion. Ambas máquinas estaban equipadas con fuentes de iones de nanoelectronebulización. Los péptidos se cargaron en una columna de retención Acclaim

PepMap 100 (Dionex) y se separaron utilizando una columna Acclaim PepMap RSLC (Dionex). Los péptidos se cargaron en la fase móvil A (ácido fórmico al 0,5 %:agua) y se eluyeron utilizando un gradiente de tampón B (acetonitrilo:ácido fórmico al 0,5 %) directamente hacia la fuente de ionización de nanonebulización.

- 5 Para la identificación de péptidos, el espectrómetro de masas se hizo funcionar utilizando un flujo de trabajo de adquisición dependiente de la información ("information dependent acquisition", IDA). La información adquirida en estos experimentos se utilizó para buscar en la base de datos Uniprot de proteínas humanas péptidos coherentes con los patrones de fragmentación observados, utilizando los programas informáticos Protein piloto (Ab Sciex) y PEAKS (Bioinformatics solutions). El programa informático asigna una puntuación a los péptidos identificados, basándose en la correspondencia entre los patrones de fragmentación observados y esperados.

10 Resultados

Los péptidos que figuran en la tabla 1, correspondientes a los SEQ ID NO: 1-17, se detectaron mediante espectrometría de masas tras su extracción de líneas celulares cancerosas. En la tabla se indica un ejemplo de línea celular a partir de la cual se detectó el péptido, junto con el anticuerpo HLA utilizado para la purificación por inmunoadfinidad.

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Anticuerpo HLA	Ejemplo de línea celular cancerosa
1	SLSNRLYYL	HLA-A*02	Colo205
2	GSEVSFLEY	clase I	Colo205
3	SLIQNLFKV	HLA-A*02	Colo205
4	LKIMNLQQI	HLA-A*02	U266
5	SIAGFVASI	HLA-A*02	Colo205
6	GSEVSFLEY	clase I	Colo205
7	TRGAPLISV	HLA-A*02	LNCaP
8	LTSRPQWALY	clase I	Colo206F
9	NPRLTVIVV	clase I	Colo205
10	EVDDRTEAY	clase I	Colo205
11	KMGGELWRV	HLA-A*02	Colo205
12	AIATKIAL	clase I	Colo206F
13	IDYNPLMEAR	clase I	A375
14	SFDSNLLSF (A24)	clase 1 (HLA-A24)	NUGC3
15	RLQQKVTEV	HLA-A*02	KATO III
16	MLIPELCYL	HLA-A*02	IM95M
17	IMIEVDDRTEA	HLA-A*02	DV90

- 15 Las figuras 1-17 muestran patrones de fragmentación representativos para los péptidos de SEQ ID NO: 1-17, respectivamente. Debajo de cada espectro se muestra una tabla con los iones correspondientes.

Ejemplo 2: Preparación de complejos de péptido-HLA recombinantes

A continuación, se describe un procedimiento adecuado para la preparación de HLA recombinante soluble cargado con péptido TAA.

Las moléculas de HLA de clase I (cadena pesada de HLA y cadena ligera de HLA ($\beta 2m$)) se expresaron por separado en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión, utilizando construcciones adecuadas. La cadena pesada de HLA contenía además un marcador de biotilación C-terminal que sustituye a los dominios transmembrana y citoplásmico (O'Callaghan *et al.* (1999), Anal. Biochem., 266: 9-15). Se lisaron células de *E. coli* y los cuerpos de inclusión se procesaron hasta alcanzar una pureza aproximada del 80 %.

Los cuerpos de inclusión de $\beta 2m$ y cadena pesada se desnaturalizaron por separado en tampón de desnaturalización (guanidina 6 M, Tris 50 mM, pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM) durante 30 min a 37 °C. Se preparó un tampón de replegamiento que contenía L-arginina 0,4 M, Tris 100 mM, pH 8,1, EDTA 2 mM, diclorhidrato de cistamina 3,1 mM y clorhidrato de cisteamina 7,2 mM. El péptido sintético se disolvió en DMSO hasta una concentración final de 4 mg/ml y se añadió al tampón de replegamiento a 4 mg/l (concentración final). A continuación, se añadió $\beta 2m$ 30 mg/l, seguido de cadena pesada 60 mg/l (concentraciones finales). Se dejó que el replegamiento se completara a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

A continuación, la mezcla se dializó contra 20 l de agua desionizada a 4 °C durante 16 h, seguida de Tris 10 mM, pH 8,1, durante 16 h más. A continuación, la solución de proteínas se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS HQ (8 ml de volumen de lecho) equilibrada con Tris 20 mM, pH 8,1. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM utilizando un purificador AKTA (GE Healthcare). El complejo de HLA-péptido eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM, y se recogieron las fracciones del pico, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Las moléculas de pHLA marcadas con biotilación se sometieron a intercambio de tampón hacia Tris 10 mM, pH 8,1, NaCl 5 mM utilizando una columna de desalinización rápida de GE Healthcare equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteínas se enfriaron en hielo y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem). A continuación, se añadieron los reactivos de biotilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado hasta pH 8), MgCl₂ 7,5 mM y enzima BirA 5 $\mu g/ml$ (purificada según O'Callaghan *et al.* (1999), Anal. Biochem., 266: 9-15). A continuación, se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche.

Las moléculas de pHLA biotiniladas se purificaron aún más mediante cromatografía de filtración en gel utilizando un purificador AKTA con una columna GE Healthcare Superdex 75 HR 10/30 preequilibrada con PBS filtrado. La mezcla de pHLA biotinilada se concentró hasta un volumen final de 1 ml, se cargó en la columna y se reveló con PBS a 0,5 ml/min. Las moléculas de pHLA biotiniladas eluyeron como un único pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteínas se agruparon, se enfriaron en hielo y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo de unión a Coomassie (PerBio), y partes alícuotas de moléculas pHLA biotiniladas se almacenaron congeladas a -20 °C.

Dichos complejos de péptido-MHC pueden utilizarse en forma soluble o pueden inmovilizarse a través de su resto de biotina C-terminal sobre un soporte sólido, para ser utilizados para la detección de linfocitos T y receptores de linfocitos T que se unen a dicho complejo. Por ejemplo, estos complejos pueden utilizarse para barrer bancos de fagos, realizar ensayos ELISA y preparar chips sensores para mediciones Biacore.

Ejemplo 3: Identificación de TCR que se unen a un complejo de péptido-MHC de la invención

Procedimiento

Los TCR de unión al antígeno se obtuvieron utilizando péptidos de la invención para barrer un banco de fagos de TCR. El banco se construyó utilizando secuencias de cadenas alfa y beta obtenidas de un repertorio natural (como se describe en los documentos WO2015/136072, WO2017046198, WO2017046201, WO2017046202, WO2017046205, WO2017046207, WO2017046208, WO2017046211 y WO2017046212). La combinación aleatoria de estas secuencias de cadenas alfa y beta, que tiene lugar durante la creación del banco, produce un repertorio no natural de combinaciones de cadenas alfa beta.

Los TCR obtenidos del banco se evaluaron mediante ELISA para confirmar el reconocimiento específico del antígeno. Los ensayos ELISA se realizaron como se describe en el documento WO2015/136072. Brevemente, se recubrieron placas de ELISA MaxiSorp de 96 pocillos con estreptavidina y se incubaron con el complejo de péptido-HLA biotinilado de la invención. Se añadieron clones de fagos portadores de TCR a cada pocillo y se llevó a cabo la detección utilizando un conjugado de anticuerpo anti-M13-HRP. El anticuerpo unido se detectó utilizando el sistema de sustrato de peroxidasa TMB Microwell de KPL labs. La aparición de un color azul en el pocillo indicaba la unión del TCR al antígeno. La ausencia de unión a complejos alternativos de péptido-HLA indica que el TCR no presenta un nivel elevado de reactividad cruzada.

Se puede obtener una confirmación adicional de que los TCR son capaces de unirse a un complejo que comprende un complejo de péptido y HLA de la invención mediante resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) utilizando TCR aislados. En este caso, las secuencias de las cadenas alfa y beta se expresan en *E.*

coli en forma de TCR solubles (documento WO2003020763; Boulter, *et al.*, Protein Eng., 2003, 16: 707-711). La unión de los TCR solubles a los complejos se analiza mediante resonancia de plasmón de superficie utilizando un instrumento BiaCore 3000. Los monómeros de péptido-HLA biotinilados se preparan como se ha descrito previamente (ejemplo 2) y se inmovilizan sobre un chip sensor CM-5 acoplado a estreptavidina. Todas las mediciones se realizan a 25 °C en tampón PBS suplementado con Tween al 0,005 % a un caudal constante. Para medir la afinidad, se hacen fluir diluciones seriadas de los TCR solubles sobre los MHC-péptidos inmovilizados y se determinan los valores de respuesta en equilibrio para cada concentración. Los datos se analizan trazando la unión específica de equilibrio frente a la concentración de proteína, seguida de un ajuste por mínimos cuadrados a la ecuación de unión de Langmuir, suponiendo una interacción 1:1.

10 *Resultados*

Los TCR que reconocen específicamente los complejos de péptido-HLA de la invención se obtuvieron del banco. La figura 18(A-C) muestra los datos de ELISA para tres de estos TCR, por péptido.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables alfa y beta de los TCR identificados en la figura 18(A-C) se proporcionan en la figura 19.

15 Estos datos confirman que se pueden aislar TCR específicos de antígeno.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, en el que el péptido forma un complejo con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).
2. Un complejo del péptido de la reivindicación 1 y una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).
- 5 3. El complejo de la reivindicación 2, en el que la molécula del MHC es MHC de clase I.
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido como se define en la reivindicación 1.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4.
6. Una célula que comprende un vector según la reivindicación 5.
- 10 7. Un resto de unión que se une al péptido de la reivindicación 1 cuando está en complejo con el MHC, en el que el resto de unión es un receptor de linfocitos T (TCR) o un anticuerpo.
8. El resto de unión de la reivindicación 7, en el que el TCR está en la superficie de una célula.
9. Un péptido como se define en la reivindicación 1, un complejo como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4, un vector como se define en la reivindicación 5, una célula como se define en la reivindicación 6 o un resto de unión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en medicina.
- 15 10. El péptido, el complejo, el ácido nucleico, el vector, la célula o el resto de unión para su uso como se define en la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.
11. Una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en la reivindicación 1, un complejo como se define en la reivindicación 2 o en la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4, un vector como se define en la reivindicación 5, una célula como se define en la reivindicación 6 o un resto de unión como se define en las reivindicaciones 7 u 8 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 12. Un procedimiento *in vitro* de identificación de un resto de unión que se une a un complejo según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que comprende poner en contacto un resto de unión candidato con el complejo y determinar si el resto de unión candidato se une al complejo, en el que el resto de unión es un TCR o un anticuerpo.
- 25

Figura 1

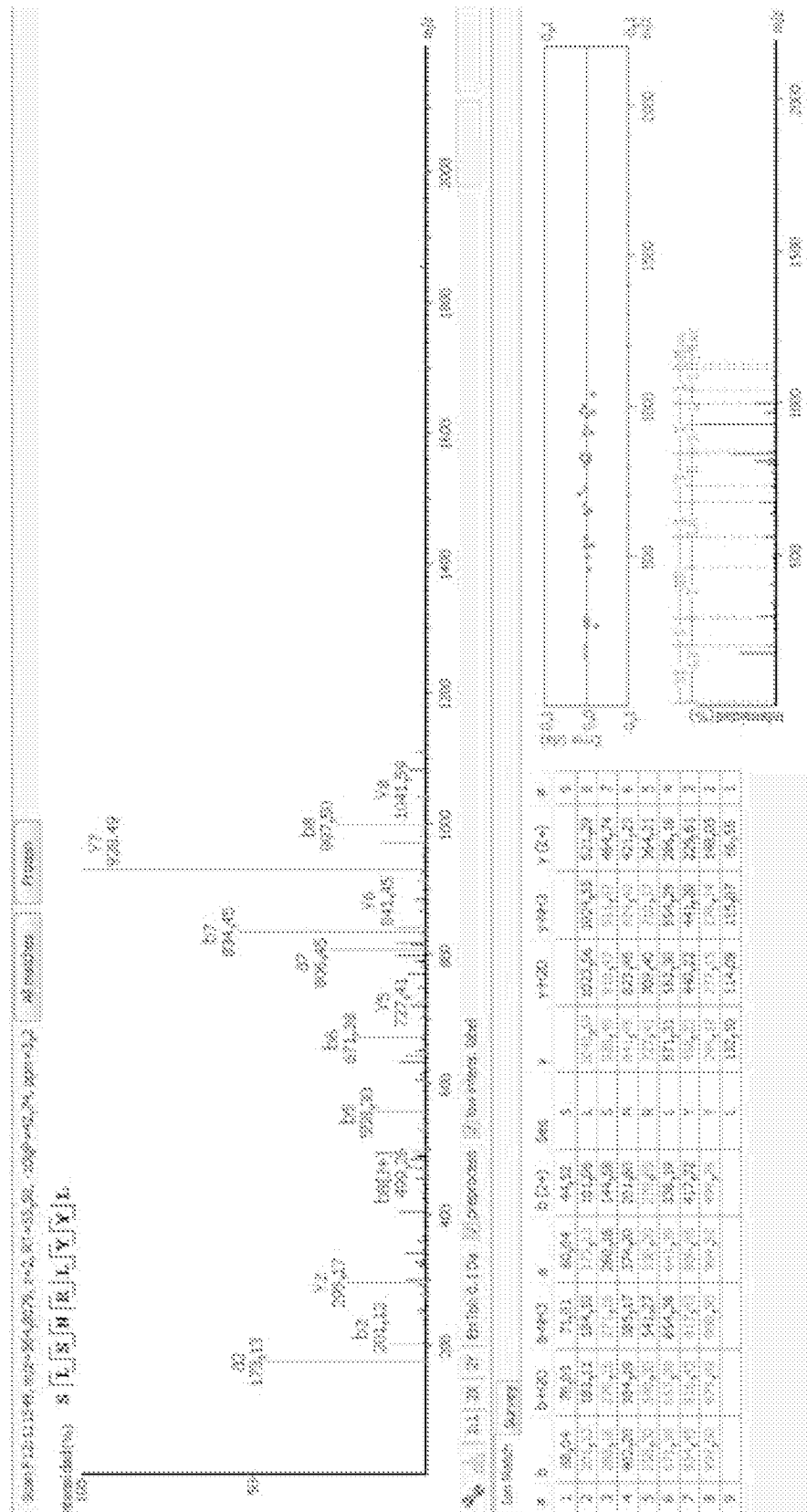


Figura 3

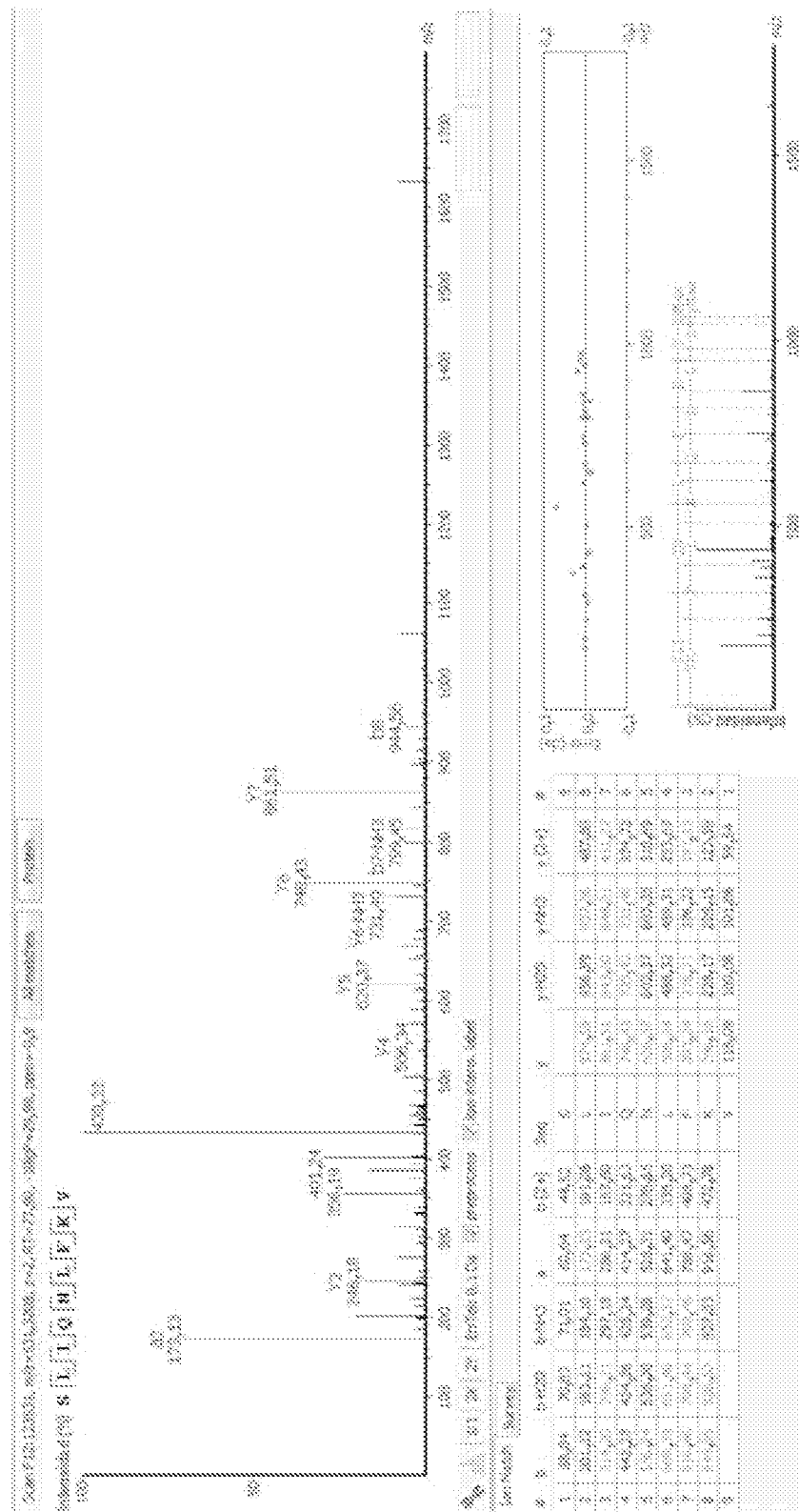


Figura 4

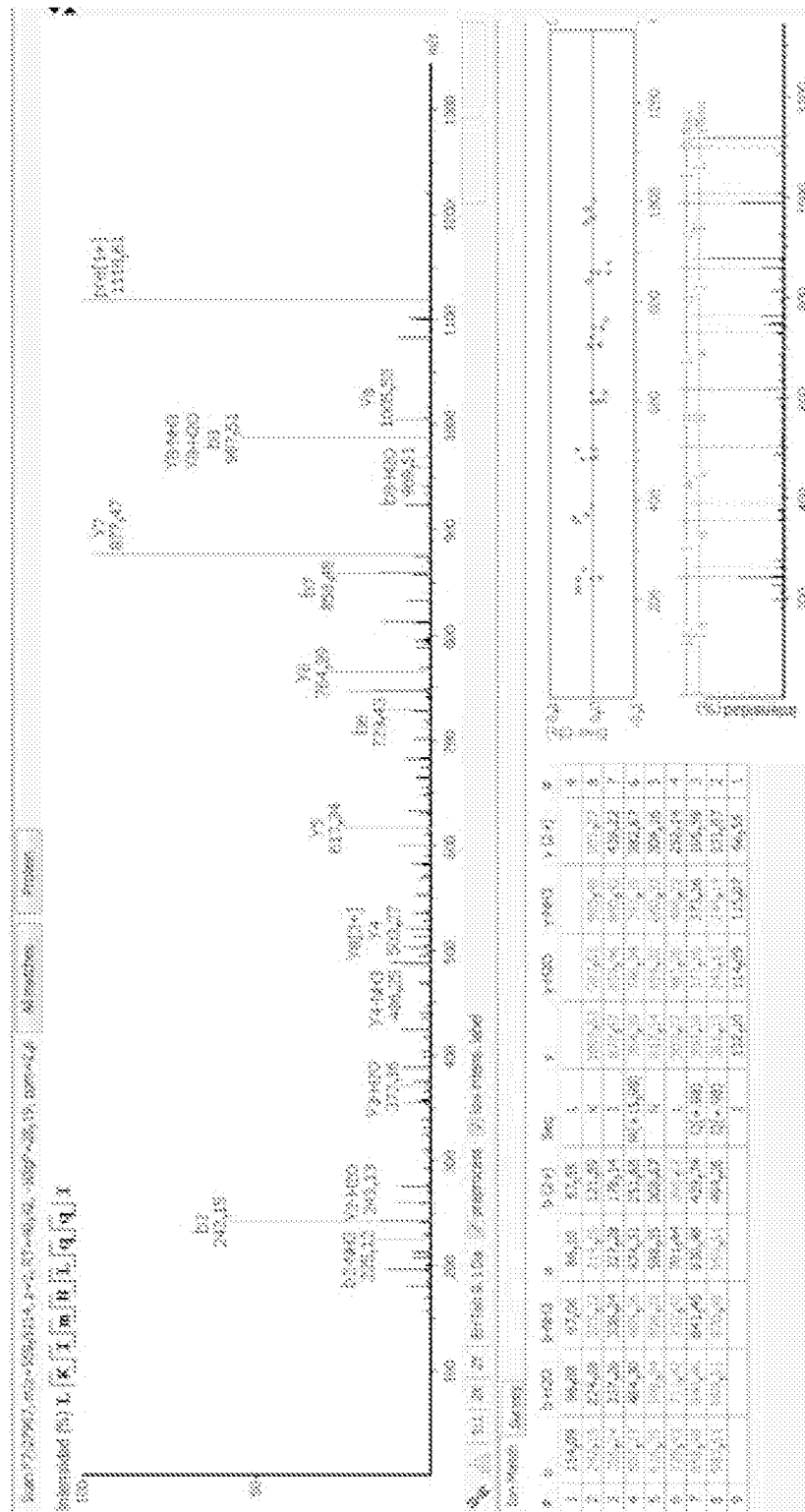


Figura 5

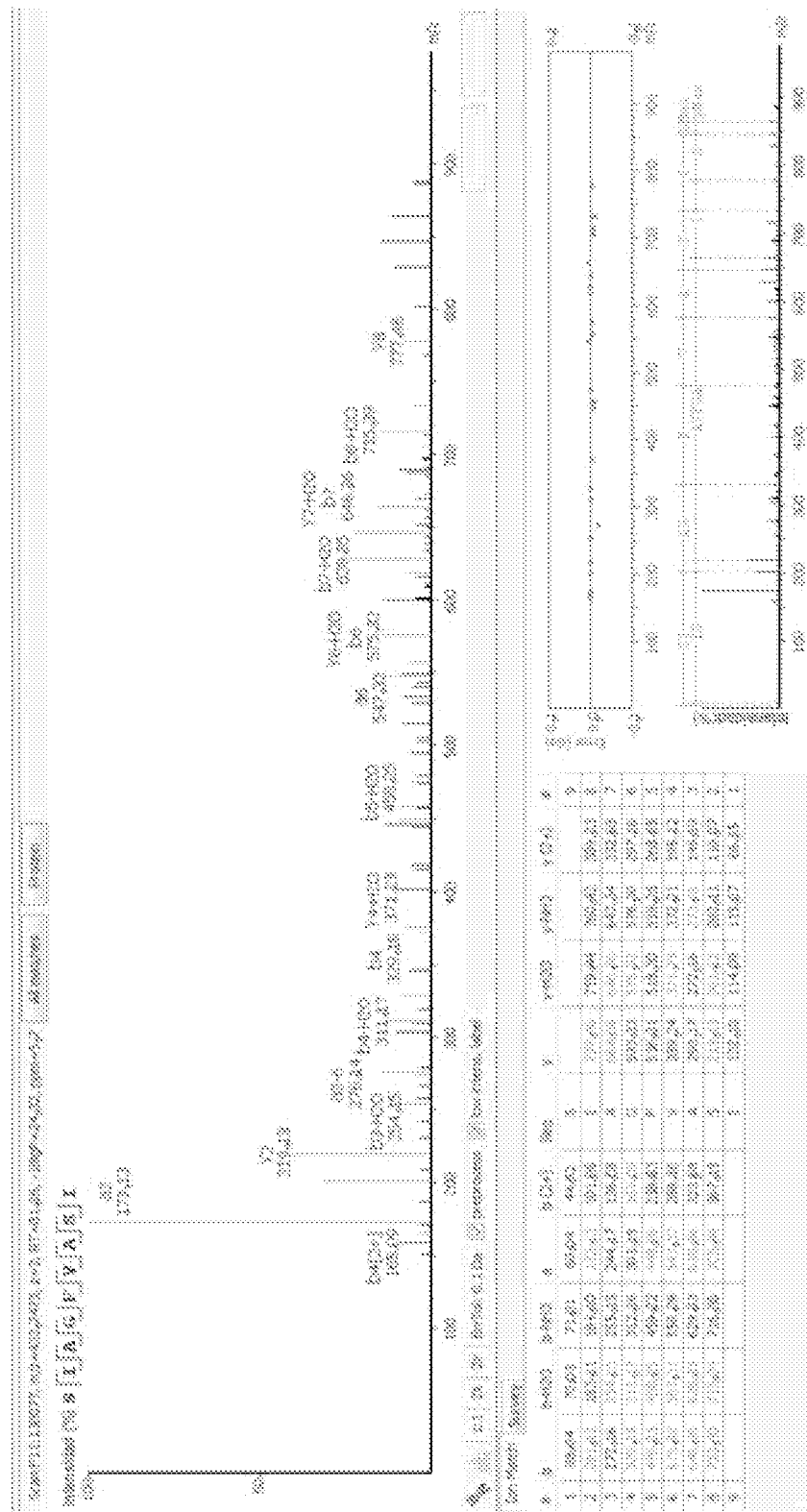


Figura 6

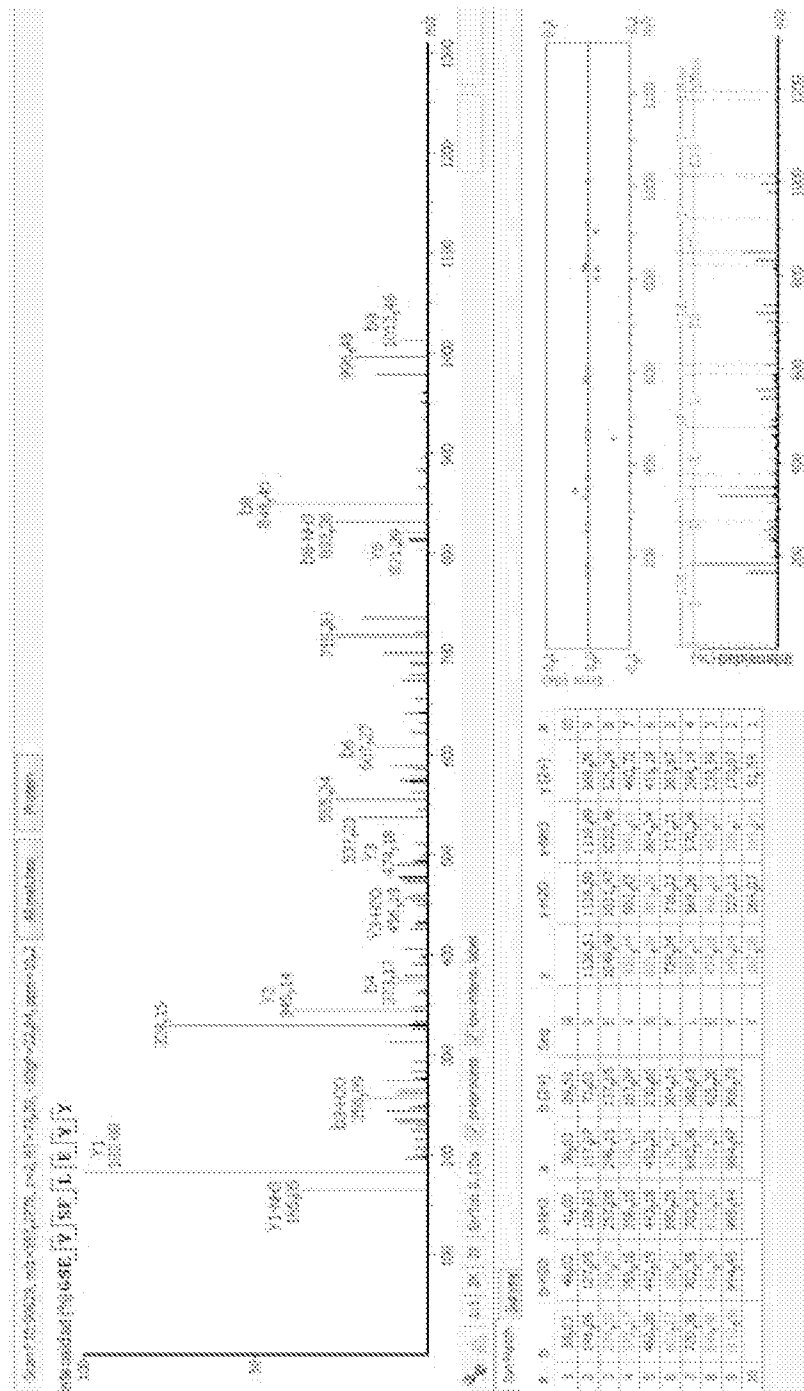


Figura 7

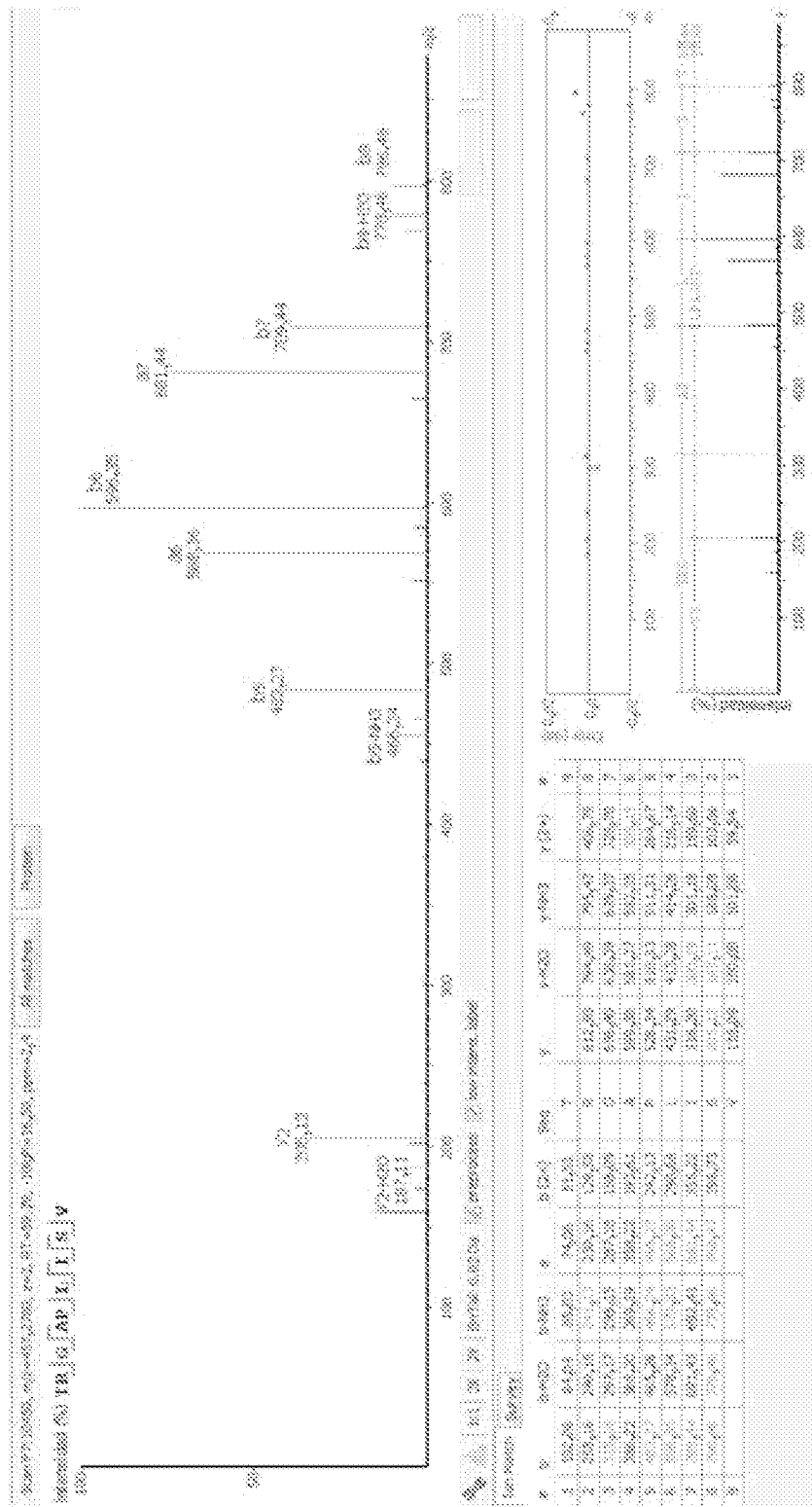


Figura 8

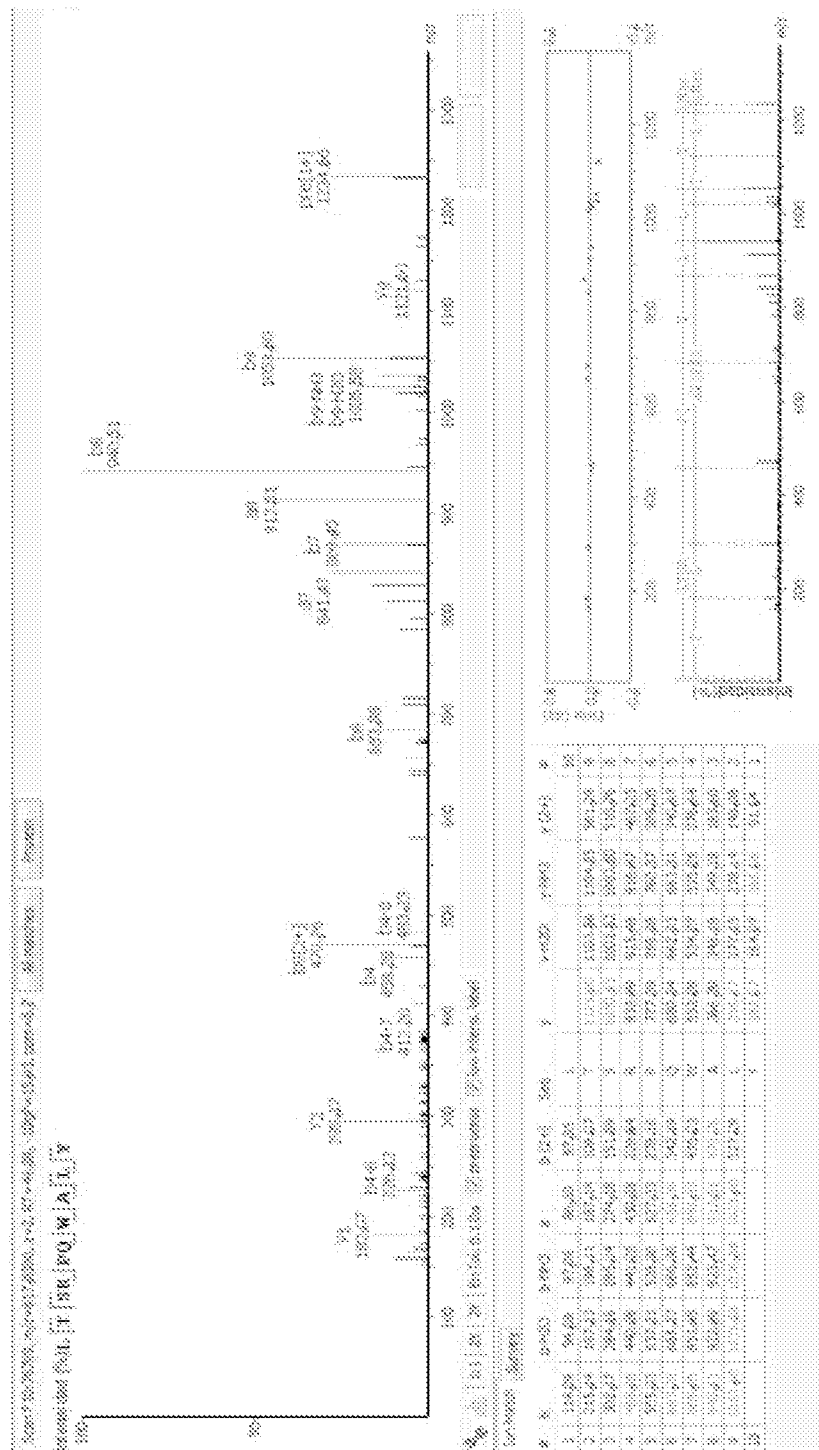


Figura 9

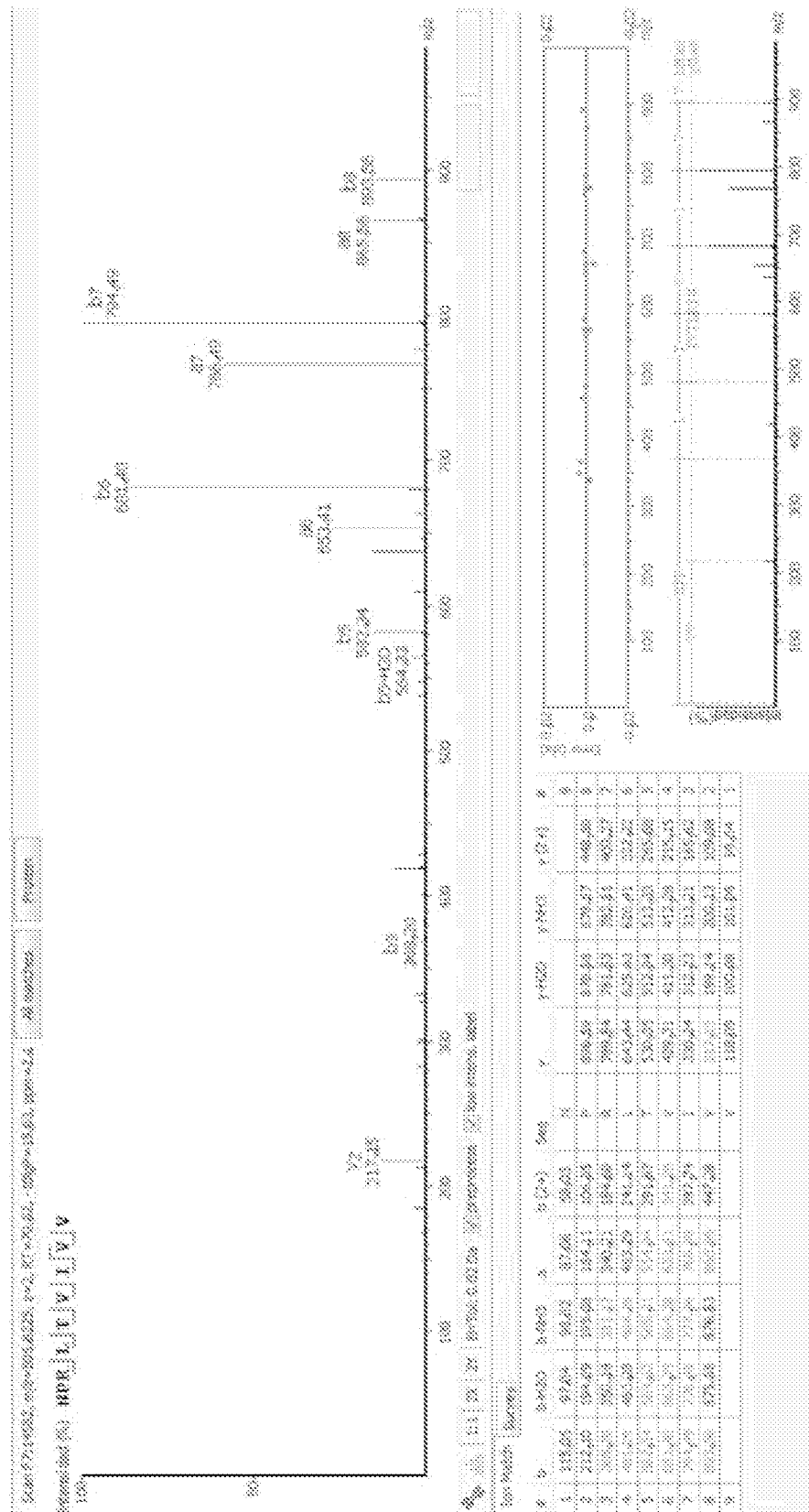


Figura 10

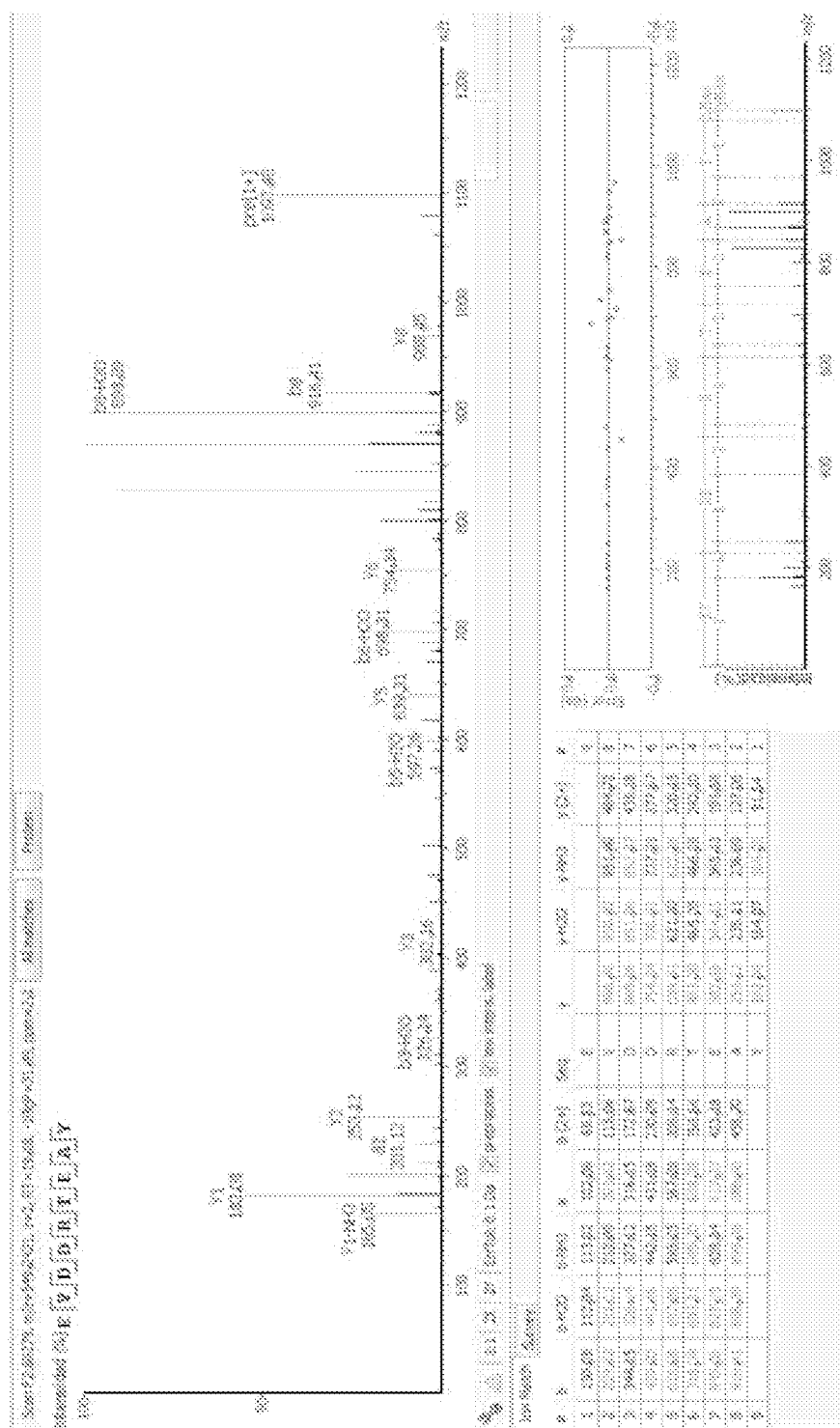


Figura 11

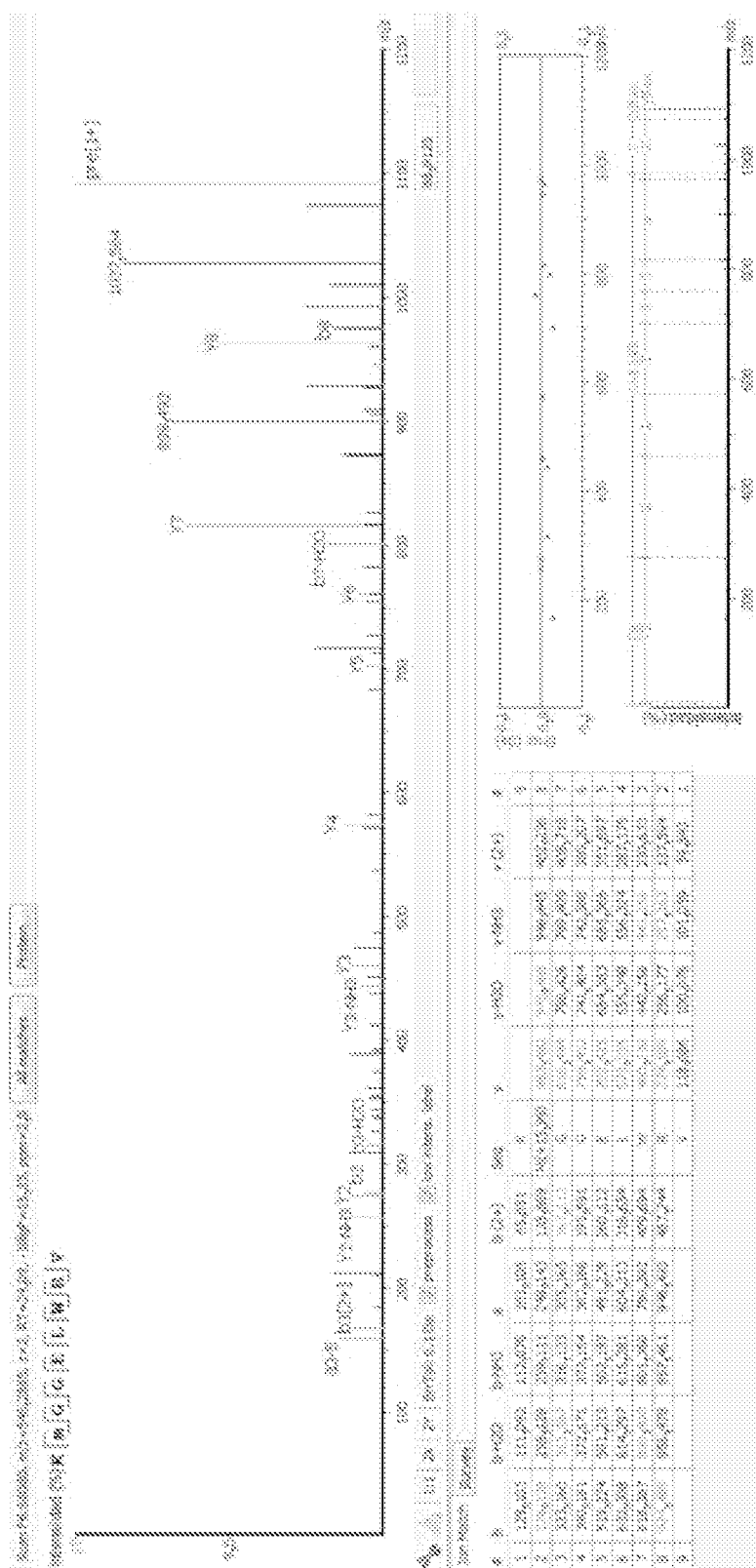


Figura 12

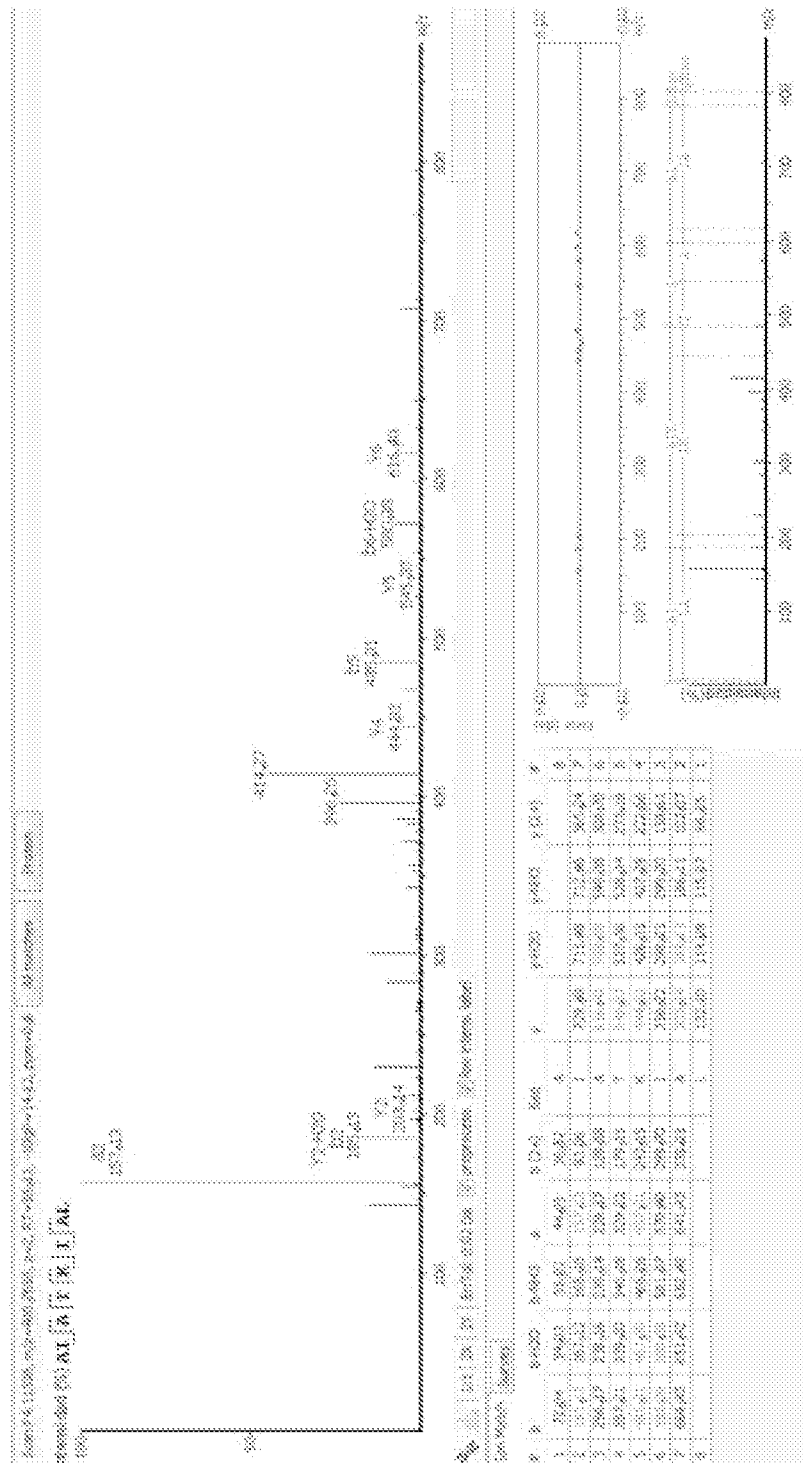


Figura 13

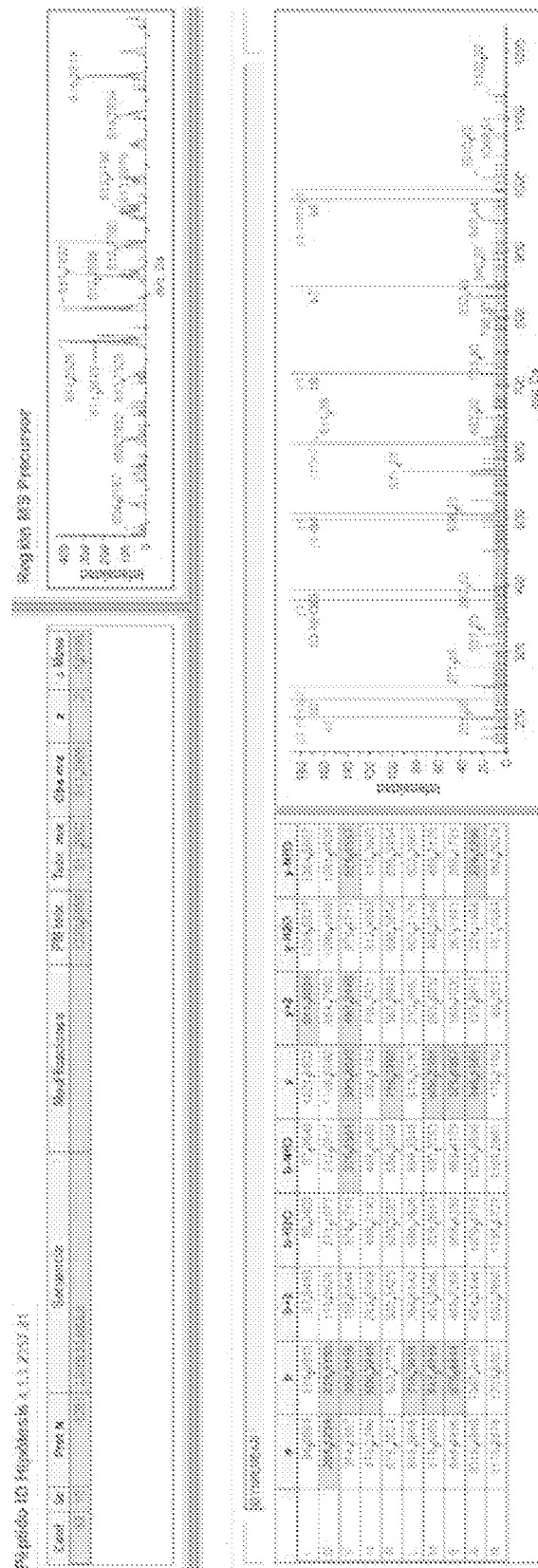


Figura 14

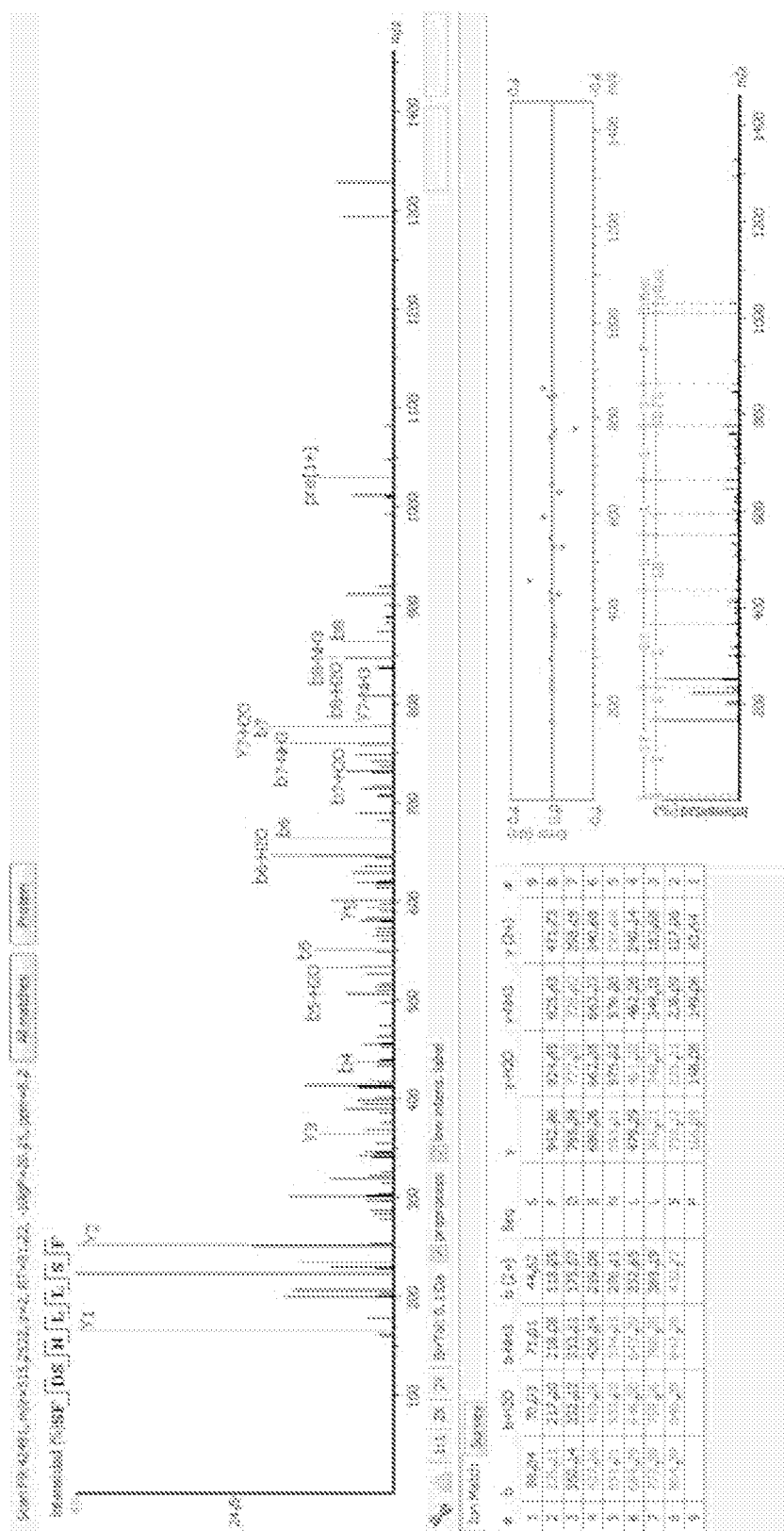


Figura 15

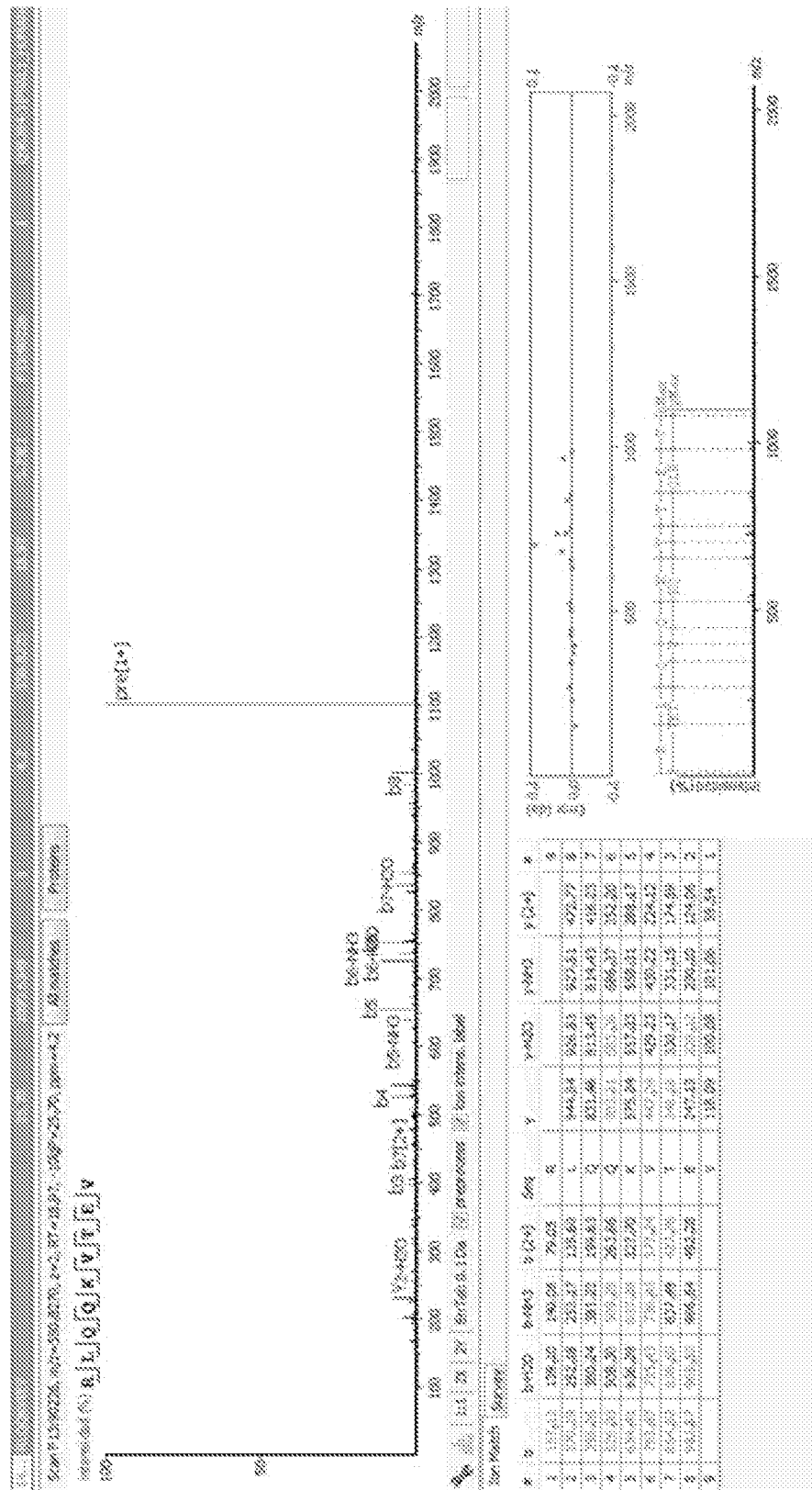


Figura 16

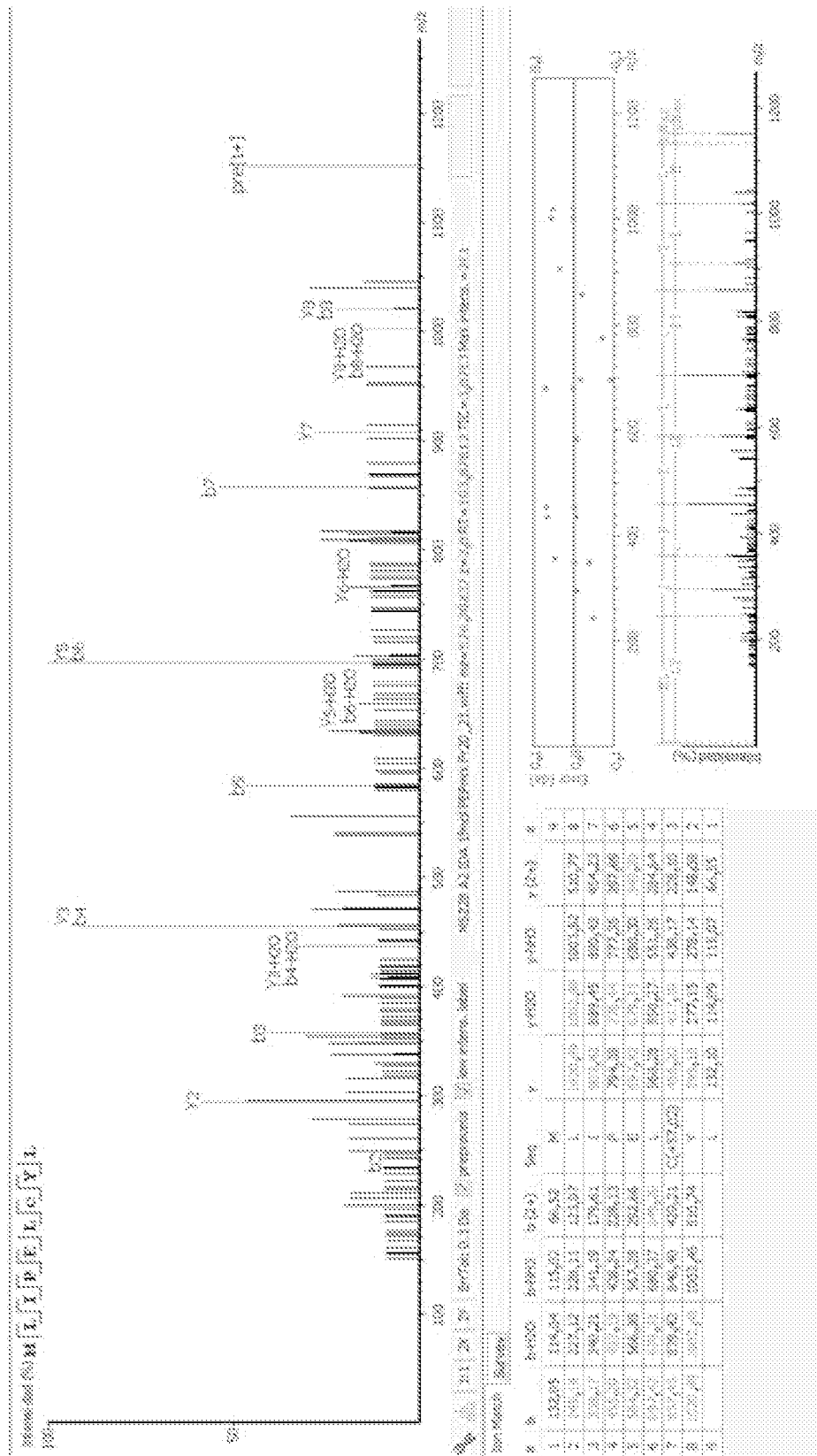


Figura 17

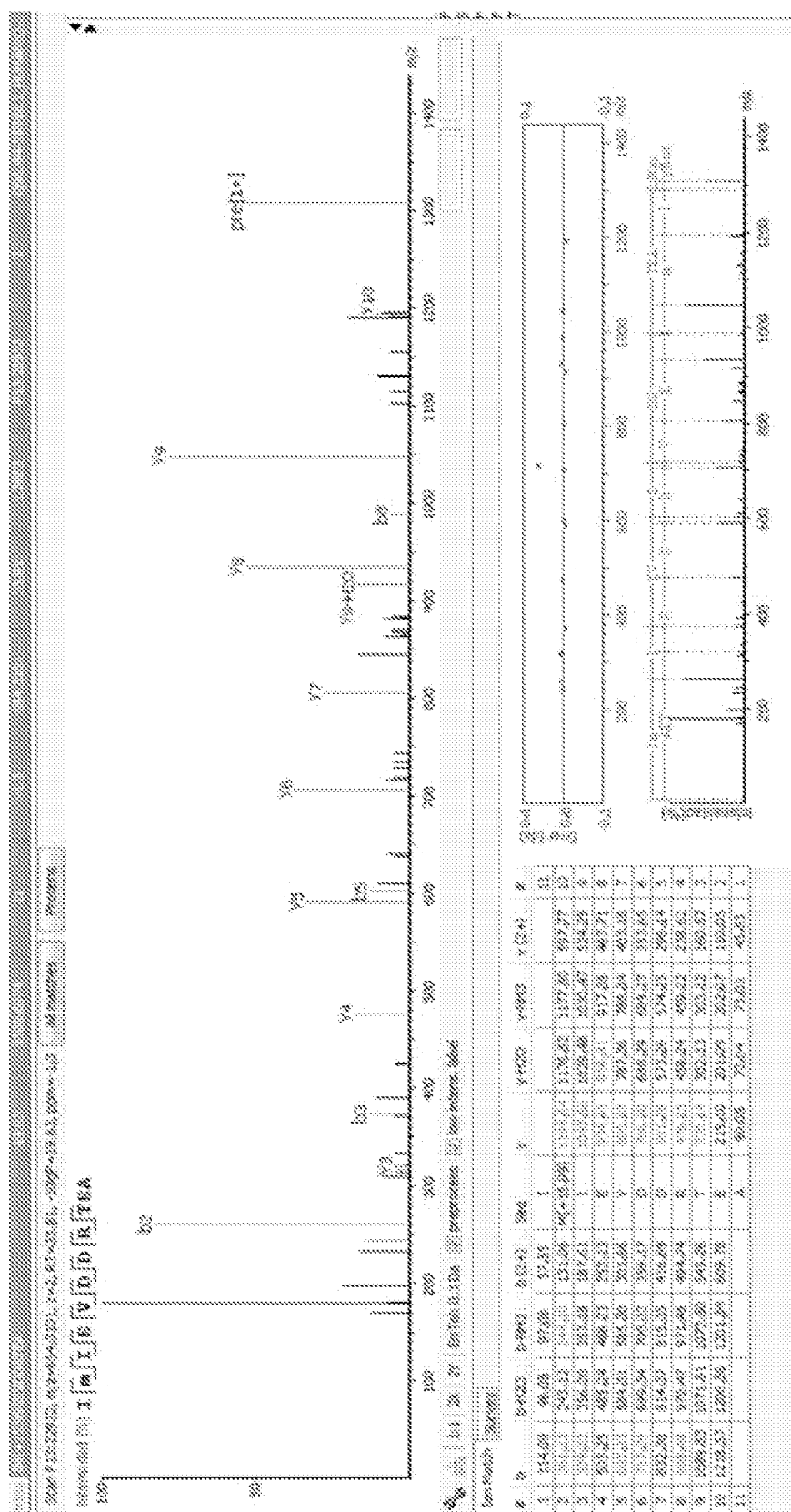


Figura 18

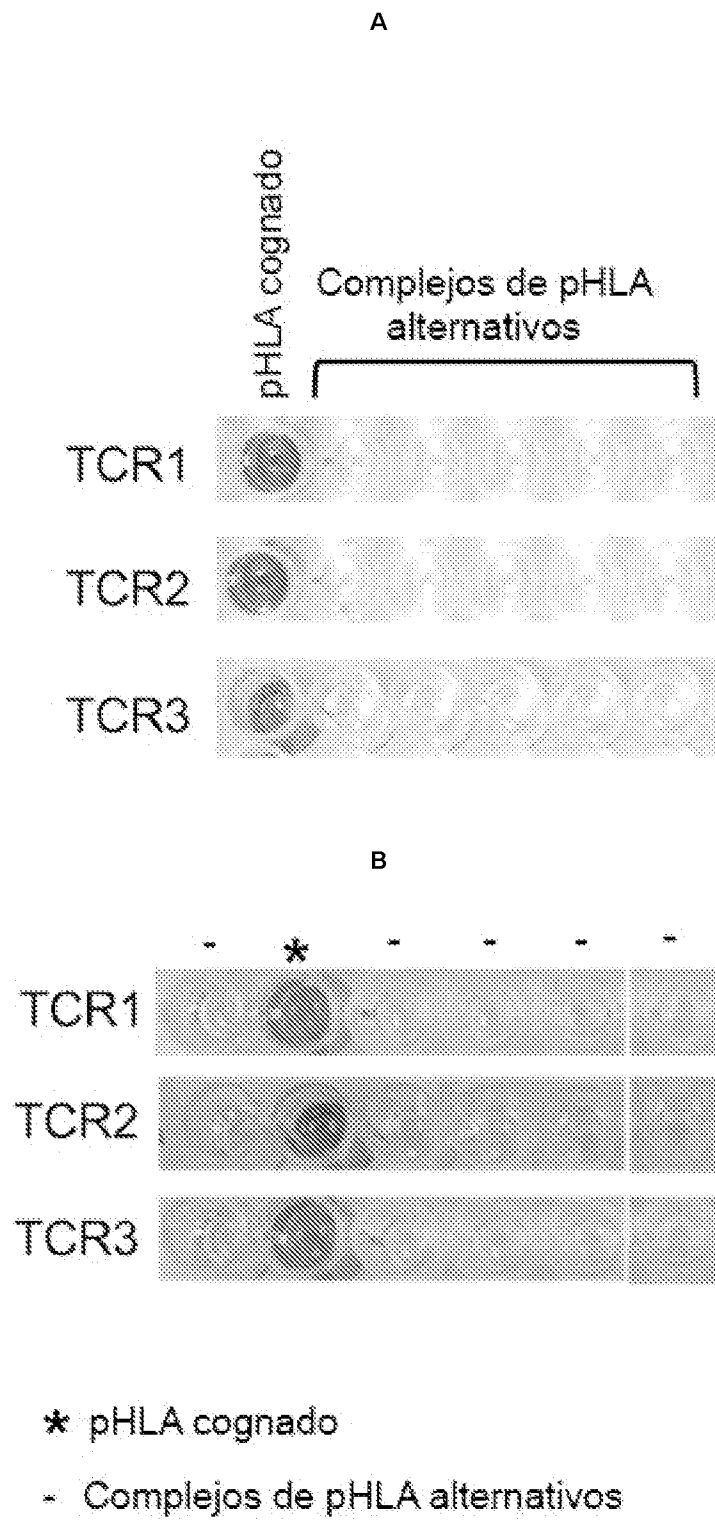


Figura 18 (continuación)

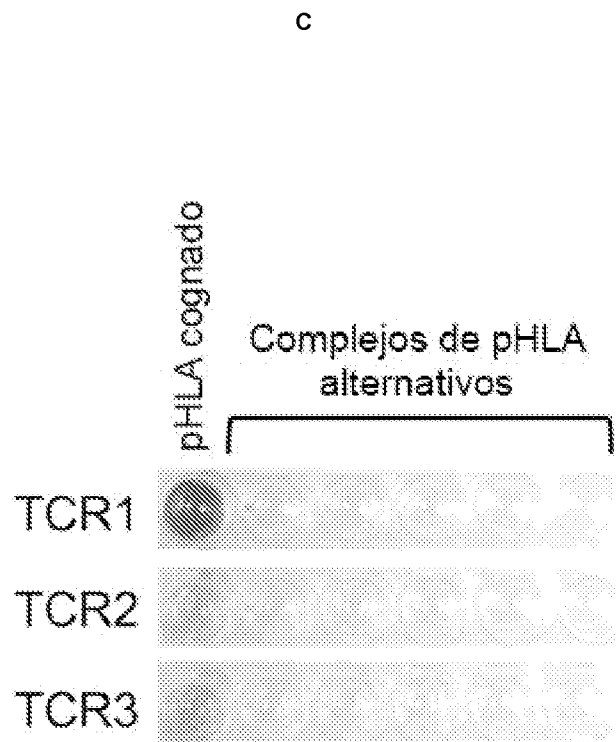


Figura 19

PIWIL1 - SLSNRLYYL

TCR1

Región variable de cadena alfa

KQEV TQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ
TSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AARYNFNKFYFGSGTKLNVKP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTT
AKGEVPDGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYTPGPSHEQYFGPGTRL
TVT

TCR2

Región variable de cadena alfa

KQEV TQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ
TSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVIDRAYSGAGSYQLTFGKGTKLS
VIP

Beta chain variable region

NAGVTQTPKFRI LKIGQSM TLQCTQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSLGVSYNEQFFGPGTRLT
VL

TCR3

Alpha chain variable region

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDK
EDGRFTAQLNKASQYVSL LIRDSQP SDSATYLC AVNDGNKLVFGAGTILRVKS

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFRI LKIGQSM TLQCTQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITD
KGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASAAGQPQHFGDGTRLSIL

Figura 19 (continuación)

PIWIL1 - SLIQNLFKV

TCR1

Región variable de cadena alfa

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDK
EDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQP SDSATYLCAVMGNTDKLIFGTGTRLQVFP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYGVGSPLHFGNGTRLTV
T

TCR2

Región variable de cadena alfa

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMSIYSNGDK
EDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQP SDSATYLCAVMDSSYKLIFGSGTRLLVRP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYGGGAEAFFGQGTRLTV
V

TCR3

Región variable de cadena alfa

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDK
EDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQP SDSATYLCAVKTSYDKVIFGPGTSLSVIP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYGAGAFYTFGSGTRLTV
V

Figura 19 (continuación)

PIWIL1 - SIAGFVASI

TCR1

Región variable de cadena alfa

KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ
TSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVDPDNNAGNMLTFGGGTRLMVKP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSSGAGYTFGSGTRLTVV

TCR2

Región variable de cadena alfa

KQEVTQIPVALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQRE
QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVSPYNNNDMRFGAGTRLTVP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTT
DKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSFTGDSPLHFGNGTRLTV
T

TCR3

Región variable de cadena alfa

KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ
TSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVGGYNKLIFGAGTRLAVHP

Región variable de cadena beta

NAGVTQTPKFRVLKTGQSM TLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT
DQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRATGLTEAFFGQGTRLTV
V