

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 320**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2006 E 15171918 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2985291**

54 Título: **Receptores de linfocitos T para el VIH de alta afinidad**

30 Prioridad:

**01.04.2005 GB 0506760**

**10.08.2005 GB 0516487**

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

**08.02.2019**

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LIMITED (50.0%)  
101 Park Drive, Milton Park  
Abingdon OX14 4RY, Oxfordshire, GB y  
ADAPT IMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAKOBSEN, BENT KARSTEN;  
DUNN, STEVEN MARK;  
LI, YI y  
MOLLOY, PETER EAMON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 699 320 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Receptores de linfocitos T para el VIH de alta afinidad

5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (los TCR) que tienen la propiedad de unirse a SLYNTVATL procedente del polipéptido Gag del VIH-HLA-A\*0201. Los TCR comprenden al menos un dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR y al menos un dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el virus causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El virus es un retrovirus envuelto que pertenece al grupo de los lentivirus. El péptido SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16) procede del producto génico g17 del gen Gag, uno de los nueve genes que constituyen el Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). El HLA-A\*0201 carga el péptido y lo presenta en la superficie de las células infectadas por el VIH. Por lo tanto, el complejo proporciona un marcador del VIH que los TCR pueden tener como objetivo, por ejemplo, con el fin de suministrar agentes citotóxicos o inmunoestimulantes a las células infectadas. Sin embargo, para ese fin, sería conveniente que el TCR tuviera una alta afinidad y/o una baja constante de disociación para el complejo péptido-HLA.

15 20 Anikeeva *et al.* (Journal of Immunological Methods 277 (2003) 75-86) describe un receptor de linfocitos T soluble procedente de un clon de linfocitos T citotóxicos CD8+ D3 humano que reconoce el péptido inmunodominante SLYNTVATL (SL9) de Gag del VIH en asociación con la proteína HLA-A2 del complejo principal de histocompatibilidad de clase 1.

25 Breve descripción de la invención

La invención proporciona en un primer aspecto un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a SLYNTVATL-HLA-A\*0201 y que comprende un dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR y un dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR CARACTERIZADO POR QUE

30 el dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR tiene la secuencia de la Figura 1a y el dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR tiene la secuencia de la Figura 1b, excepto que uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena alfa 95T, 96N, 97S, 98G y 100A, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1a, está/están mutado(s) y/o uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena beta 51Y, 52E, 53E y 54E, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1b, está/están mutado(s).

35 El TCR puede comprender uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena alfa 95S, 95G, 96A, 97H, 98D o 100S, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1a y/o uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena beta 51V, 51A, 52R, 52L, 53G o 54V, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1b.

40 El TCR puede comprender una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena alfa mostrados en la Figura 6a, 6b o 6c y/o una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena beta mostradas en la Figura 7a o 7b. El TCR puede comprender los emparejamientos de las regiones variables de las cadenas alfa y beta mostradas en la siguiente tabla:

Secuencia de la región variable de la cadena alfa, Figura n.º	Secuencia de la región variable de la cadena beta, Figura n.º
1a	7a
1a	7b
6a	1b
6b	1b
6c	1b
6b	7b
6c	7b
6b	7a
6c	7a

45 El TCR del primer aspecto puede comprender adicionalmente la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena alfa mostrada en la Figura 8a, y/o una de las secuencias del dominio constante de aminoácidos de la

cadena beta que se muestra en las Figuras 8b y 8c, que comprende opcionalmente una o más sustituciones fenotípicamente silenciosas.

El TCR puede ser un TCR dimérico que comprende:

- 5 un primer polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR, y  
 10 un segundo polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR, estando los primero y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro entre restos de cisteína que sustituyen a Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1 \*01 o TRBC2\*01

15 El TCR puede estar unido covalentemente a un agente terapéutico o una fracción detectable.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos TCR del primer aspecto.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula que alberga un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR del primer aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un TCR del primer aspecto, o un complejo de TCR multivalente del segundo aspecto, o una pluralidad de células del tercer aspecto, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Descripción detallada de la invención

La medición de la  $K_D$  y/o la ( $k_{off}$ ) en el presente documento puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos. Un método preferente es el método de resonancia de plasmón superficial (Biacore) del Ejemplo 4.

30 A efectos de comparación, la interacción de una variante soluble unida por disulfuros del TCR para gag del VIH parental (ver la SEQ ID NO: 9 para la cadena  $\alpha$  de TCR y la SEQ ID NO: 10 para la cadena  $\beta$  de TCR) y el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 tiene una  $K_D$  de aproximadamente 85 nM y una constante de disociación ( $k_{off}$ ) de  $2,21 \times 10^{-2} S^{-1}$ , medidas por el método basado en Biacore del Ejemplo 4.

35 El TCR para Gag del VIH parental específico para el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 tiene el siguiente uso de los genes de la cadena Valfa y la cadena Vbeta:

40 Cadena alfa - TRAV12.2  
 Cadena beta: - TRBV 5.6

45 El TCR para Gag del VIH parental se puede usar como un molde a partir de cual se pueden producir los TCR de la invención con alta afinidad y/o baja constante de disociación para la interacción entre dichos TCR y el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201. Por lo tanto, la invención se refiere a TCR que están mutados con respecto al dominio variable de la cadena  $\alpha$  (véase la Figura 1a y la SEQ ID NO: 1) y/o el dominio variable de la cadena  $\beta$  (véase la Figura 1b y SEQ ID NO: 2) del TCR para Gag parental en al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de las mismas y, opcionalmente, en al menos una región marco conservada del dominio variable de las mismas. Además, se contempla que otras regiones hipervariables en los dominios variables de los TCR de la invención, tales como las regiones hipervariables 4 (HV4), puedan mutarse dentro de un TCR mutante de alta afinidad.

50 La presentación en fagos proporciona un medio mediante el cual se pueden generar bibliotecas de variantes del TCR. Los métodos adecuados para la presentación en fagos y la posterior exploración de bibliotecas de variantes de TCR conteniendo cada una un enlace disulfuro entre cadenas no nativo se detallan en (Li *et al.*, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) y el documento WO 2004/04404.

60 Los TCR nativos existen en las formas heterodiméricas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Sin embargo, se han demostrado anteriormente que los TCR recombinantes que consisten en una única cadena de TCR  $\alpha$  o TCR  $\beta$  se unen a las moléculas de péptido MHC.

65 Como será obvio para los expertos en la materia, la mutación (o mutaciones) en la secuencia de la cadena  $\alpha$  de TCR y/o la secuencia de la cadena  $\beta$  de TCR pueden ser una o más de sustituciones, deleciones o inserciones. Estas mutaciones pueden llevarse a cabo utilizando cualquier método apropiado, incluyendo, pero sin limitación, los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), procedimientos de clonación basados en enzimas de restricción o clonación independiente de ligación (LIC). Estos métodos se detallan en muchos de los textos de

biología molecular habituales. Para detalles adicionales con respecto a la mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación basada en enzimas de restricción, véase (Sambrook y Russell, (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª Ed.) CSHL Press). Puede encontrar información adicional sobre los procedimientos de LIC en (Rashtchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6 (1): 30-6)

Cabe señalar que cualquier TCR  $\alpha\beta$  que comprenda un uso similar de los genes de Valfa y Vbeta y, por lo tanto, una secuencia de aminoácidos del TCR para Gag del VIH podría ser un TCR de molde conveniente. Entonces sería posible introducir en el ADN que codifica uno o ambos dominios variables del TCR  $\alpha\beta$  molde los cambios necesarios para producir los TCR mutados de alta afinidad de la invención. Como será obvio para los expertos en la materia, las mutaciones necesarias podrían introducirse mediante varios métodos, por ejemplo, mutagénesis dirigida.

A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos de TCR en el presente documento en general se proporcionan incluyendo un resto de metionina (Met o M) N-terminal. Como sabrán los expertos en la materia, este resto puede eliminarse durante la producción de proteínas recombinantes. Como también será obvio para los expertos en la materia, puede ser posible truncar las secuencias proporcionadas en el extremo C y/o el extremo N de las mismas, en 1, 2, 3, 4, 5 o más restos, sin afectar sustancialmente las características de unión a pMHC del TCR, todas estas variantes triviales están abarcadas por la presente invención.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "región variable" abarca todos los aminoácidos de un TCR dado que no están incluidos dentro del dominio constante codificado por el gen TRAC para las cadenas  $\alpha$  de TCR y los genes TRBC1 o TRBC2 para las cadenas  $\beta$  de TCR. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "dominio variable" abarca todos los aminoácidos de un TCR dado que están codificados por un gen TRAV para las cadenas  $\alpha$  de TCR y un gen TRBV para las cadenas  $\beta$  de TCR. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

Como conocen los expertos en la materia, parte de la diversidad del repertorio del TCR se debe a las variaciones que se producen en el aminoácido codificado por el codón en el límite entre la región variable, como se define en el presente documento, y el dominio constante. Por ejemplo, el codón que está presente en este límite en la secuencia de TCR para Gag de VIH parental da como resultado la presencia del resto de Histidina (H) en el C-terminal de las secuencias de la región variable en el presente documento. Esta histidina reemplaza el resto de Asparagina (N) N-terminal codificado por el gen TRAC mostrado en la Figura 8a.

Los TCR de la invención pueden comprender la mutación de uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena alfa correspondientes a: 95T, 96N, 97S, 98G y 100A a los aminoácidos:

- 95S o G
- 96A
- 97H
- 98D
- 100S

La numeración utilizada anteriormente es la misma que se muestra en la Figura 1a y la SEQ ID NO: 1.

Los TCR de la invención pueden comprender la mutación de uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena beta correspondientes a los enumerados a continuación, con respecto al aminoácido que aparece en estas posiciones en la secuencia proporcionada para la región variable de la cadena alfa del TCR para Gag del VIH nativo de la cadena beta del TCR para Gag del VIH nativo en la Figura 1b y la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos que se pueden mutar a los que se hace referencia son: 51Y, 52E, 53E y 54E a:

- 51V o A
- 52R o L
- 53G
- 54V

La numeración utilizada anteriormente es la misma que se muestra en la Figura 1b y la SEQ ID NO: 2

Los TCR de la invención pueden comprender una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena alfa mutadas que se muestran en la Fig. 6 (las SEQ ID NO: 11 a 13). Las variantes fenotípicamente silenciosas de tales TCR también forman parte de la presente invención.

Los TCR de la invención pueden comprender una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena beta mutados mostrados en la Figura 7. (las SEQ ID NO: 14 y 15). Las variantes fenotípicamente silenciosas de tales TCR también forman parte de la presente invención.

Los TCR nativos existen en las formas heterodiméricas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Sin embargo, se ha demostrado anteriormente que los TCR recombinantes que consisten en homodímeros  $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$  se unen a las moléculas de péptido MHC.

5 Los TCR de la invención pueden comprender la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena alfa y las combinaciones de secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena beta que se enumeran a continuación:

Secuencia de la región variable de la cadena alfa, SEQ ID NO:	Secuencia de la región variable de la cadena beta, SEQ ID NO:
1	2
1	14
1	15
11	2
12	2
13	2
12	15
13	15
12	14
13	14

10 Los TCR de la invención pueden comprender las combinaciones de regiones variables detalladas anteriormente, comprenden adicionalmente la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena alfa que mostrada en la Figura 8a (SEQ ID NO: 19) y una de las secuencias del dominio constante de aminoácidos de la cadena beta mostrada en las Figuras 8b y 8c (las SEQ ID NO: 20 y 21) o las variantes fenotípicamente silenciosas de las mismas. Como se usa en el presente documento, la expresión "variantes fenotípicamente silenciosas" se refiere a los TCR que incorporan cambios menores en el dominio constante y/o las regiones variables de los mismos en comparación con los detallados anteriormente, sin alterar la afinidad y/o la constante de disociación para la interacción con el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201. En un amplio aspecto, los TCR de la invención están en forma de TCR monocatenarios (TCRmc) o de TCR diméricos (TCRd), como se describe en los documentos WO 04/033685 y WO 03/020763.

20 Una forma adecuada de TCRmc comprende un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR, y una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

25 Como alternativa, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\beta$  de TCR, el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR

30 Los TCRmc anteriores pueden comprender adicionalmente un enlace disulfuro entre las primera y segunda cadenas, siendo dicho enlace disulfuro uno que no tiene equivalente en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$  nativos, y en donde la longitud de la secuencia enlazadora y la posición del enlace disulfuro son tales que las secuencias del dominio variable del primero y segundo segmentos se orientan de forma recíproca sustancialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos.

35 De forma más concreta, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR, el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\beta$  de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR, y se puede proporcionar un enlace disulfuro entre la primera y segunda cadenas, siendo dicho enlace disulfuro uno que no tiene equivalente en los receptores de linfocitos T $\alpha\beta$  nativos.

En las formas de TCRmc anteriores, la secuencia enlazadora puede unir el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento, y puede tener la fórmula -PGGG-(SGGGG)<sub>n</sub>-P- en donde n es 5 o 6 y P es prolina, G es glicina y S es serina.

-PGGG-SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQIDNO: 17)

-PGGG-SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEQ ID NO: 18)

5

Una forma de TCRd adecuada de los TCR de la presente invención comprende un primer polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena α de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α de TCR, y un segundo polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena β de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β de TCR, estando los primero y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro que no tiene equivalente en receptores de linfocitos T αβ nativos.

10

15

El primer polipéptido puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena α de TCR fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α de TCR, y un segundo polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena β de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β de TCR, estando los primero y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro entre restos de cisteína que sustituyen a Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01 o los equivalentes no humanos de los mismos. ("TRAC", etc. nomenclatura en el presente documento según T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

20

25

La forma de TCRd o TCRmc de los TCR de la invención puede tener secuencias de aminoácidos correspondientes a las secuencias del dominio constante extracelular y de región variable del TCR αβ humano, y un enlace disulfuro puede unir los restos de aminoácidos de dichas secuencias del dominio constante, cuyo enlace disulfuro no tiene equivalente en TCR nativos. El enlace disulfuro está entre los restos de cisteína correspondientes a los restos de aminoácidos cuyos átomos de carbono β están separados por menos de 0,6 nm en los TCR nativos, por ejemplo entre restos de cisteína que sustituyen a Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01 o los equivalentes no humanos de los mismos. Otros sitios donde se pueden introducir cisteínas para formar el enlace disulfuro son los siguientes restos en el exón 1 de TRAC\*01 para la cadena α de TCR y TRBC1\*01 o TRBC2\*01 para la cadena β de TCR:

30

cadena α del TCR	cadena β del TCR	Separación de los carbonos β nativos (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

35

Además del enlace disulfuro no nativo al que se hace referencia anteriormente, la forma TCRs o TCRmc de los TCR de la invención puede incluir un enlace disulfuro entre los restos correspondientes a los unidos por un enlace disulfuro en los TCR nativos.

40

La forma TCRd o TCRmc de los TCR de la invención preferentemente no contiene una secuencia correspondiente a secuencias transmembrana o citoplásmicas de los TCR nativos.

45

Los TCR de la invención se unen fuertemente al SLYNTVATL-HLA-A2\*0201. Estos TCR también se unen, en cierta medida, a las variantes de origen natural modificadas pero aún útiles de SLYNTVATL procedente de Gag del VIH cuando está cargado en el HLA-A\*0201. Las variantes del SLYNTVATL que se han aislado de pacientes con SIDA incluyen las siguientes (Sewell *et al.*, (1997) Eur J Immunol. 27: 2323-2329):

SLFNTVATL

SLFNTVAVL

50

SLSNTVATL

SSFNTVATL

55

SLLNTVATL

SLYNTIATL

SLYNTIAVL

5 SLENTIATL

SLENTIAVL

10 SLENEVATL

Los aminoácidos mutados están subrayados.

#### *Monómeros de TCR PEGilados*

15 El TCR de la invención puede estar asociado con al menos una cadena (o cadenas) de polialquilenglicol. Esta asociación puede provocarse de varias maneras conocidas por los expertos en la materia. La cadena (o cadenas) de polialquileo pueden estar unidas covalentemente al TCR. En una realización adicional, las cadenas de polietilenglicol del presente aspecto de la invención comprenden al menos dos unidades de repetición de polietileno.

#### *Complejos de TCR multivalentes*

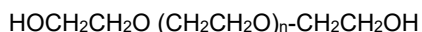
Un aspecto de la invención proporciona un complejo de TCR multivalente que comprende, al menos, dos TCR de la invención. Al menos dos moléculas de TCR pueden estar unidas a través de fracciones enlazadoras para formar complejos multivalentes. Preferentemente, los complejos son solubles en agua, por lo que la fracción enlazadora debe seleccionarse en consecuencia. Además, es preferente que la fracción enlazadora tenga la capacidad de unirse a posiciones definidas en las moléculas de TCR, de modo que se minimice la diversidad estructural de los complejos formados. Puede proporcionarse un complejo de TCR en donde la secuencia de la cadena de polímero o del enlazador peptídico se extiende entre los restos de aminoácido de cada TCR que no están emplazados en una secuencia de la región variable del TCR.

30 Dado que los complejos de la invención pueden usarse en medicina, las fracciones enlazadoras deben elegirse teniendo en cuenta su idoneidad farmacéutica, por ejemplo, su inmunogenicidad.

35 Se conocen en la técnica ejemplos de fracciones enlazadoras que cumplen los criterios convenientes anteriores, por ejemplo, la técnica de unir fragmentos de anticuerpo.

Existen dos clases de enlazadores que son preferentes para su uso en la producción de las moléculas de TCR multivalentes de la presente invención. Un complejo de TCR de la invención puede tener los TCR unidos por una cadena de polialquilenglicol.

40 Los primeros son polímeros hidrófilos tales como los polialquilenglicoles. Los más utilizados de esta clase están basados en polietilenglicol o PEG, cuya estructura se muestra a continuación.



45 en donde n es mayor que dos. Sin embargo, otros basados en otros polialquilenglicoles adecuados, opcionalmente sustituidos, incluyen polipropilenglicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol.

Dichos polímeros pueden usarse para tratar o conjugar agentes terapéuticos, particularmente polipéptidos o proteínas terapéuticas, para lograr cambios beneficiosos en el perfil de PK del agente terapéutico, por ejemplo, aclaramiento renal reducido, semivida en plasma mejorada, inmunogenicidad reducida y solubilidad mejorada. Se cree que tales mejoras en el perfil de PK del conjugado terapéutico de PEG son el resultado de la molécula o moléculas de PEG que forman una 'cubierta' alrededor del agente terapéutico, lo que impide estéricamente la reacción con el sistema inmunitario y reduce la degradación proteolítica. (Casey *et al.*, (2000) Tumor Targeting 4 235-244). El tamaño del polímero hidrófilo usado se puede seleccionar en particular sobre la base del uso terapéutico pretendido del complejo de TCR. Hay numerosos artículos de revisión y libros que detallan el uso del PEG y de moléculas similares en formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, véase Harris (1992) Polyethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, Nueva York, NY. o Harris y Zalipsky (1997) Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol ACS Books, Washington, D.C.

60 El polímero utilizado puede tener una conformación lineal o ramificada. Las moléculas de PEG ramificadas, o derivados de las mismas, se puede inducir mediante la adición de fracciones de ramificación que incluyen glicerol y oligómeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol y lisina.

65 Habitualmente, el polímero tendrá en su estructura un grupo o grupos químicamente reactivos, por ejemplo, en uno o ambos extremos y/o en las ramificaciones a partir de cadena principal, para permitir que el polímero se una a los

sitios diana en el TCR. Este grupo o grupos químicamente reactivos pueden unirse directamente al polímero hidrófilo o puede haber un grupo/fracción espaciadora entre el polímero hidrófilo y el grupo químico reactivo como se muestra a continuación:

5 grupo químico reactivo-polímero hidrófilo-grupo químico reactivo

grupo químico reactivo-espaciador-polímero hidrófilo-espaciador grupo químico reactivo

10 El espaciador utilizado en la formación de construcciones del tipo descrito anteriormente puede ser cualquier fracción orgánica que sea una cadena no reactiva, químicamente estable. Dichos espaciadores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

- $(CH_2)_n$ - en donde  $n = 2$  a  $5$

- $(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2$

15 Un complejo de TCR de la invención puede tener un radical espaciador de alquileo divalente emplazado entre la cadena de polialquilenglicol y su punto de unión a un TCR del complejo.

20 Un complejo de TCR de la invención puede tener una cadena de polialquilenglicol que comprende al menos dos unidades de repetición de polietilenglicol.

25 Hay varios proveedores comerciales de polímeros hidrófilos unidos, directamente o a través de un espaciador, a grupos químicos reactivos que pueden ser de utilidad en la presente invención. Estos proveedores incluyen Nektar Therapeutics (CA, EE. UU.), NOF Corporation (Japón), Sunbio (Corea del Sur) y Enzon Pharmaceuticals (NJ, EE. UU.).

Los polímeros hidrófilos disponibles en el mercado unidos, directamente o a través de un espaciador, a grupos químicos reactivos que pueden ser de utilidad en la presente invención incluyen, pero no se limitan, los siguientes:

Descripción del enlazador de PEG	Fuente de PEG	Número de catálogo
<b>Unión del monómero de TCR</b>		
5K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOHO1
20K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOPO1
20K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20K ramificado (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL2-200MA
30K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
Descripción del enlazador de PEG	Fuente de PEG	Número de catálogo
PEG 40K ramificado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTO1
5K-NP lineal (para unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10K-NP lineal (para unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20K-NP lineal (para unión de Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T
<b>Enlazadores de dímeros de TCR</b>		
3,4K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2DOFO2
5K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOHOF
10K lineal (con enlazadores de ortopiridil ds en lugar de Maleimida)	Sunbio	
20K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOPOF
20K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	
40K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTOF

Descripción del enlazador de PEG	Fuente de PEG	Número de catálogo
<b>Multímeros de TCR de un orden superior</b>		
15K, 3 brazos, Mal <sub>3</sub> (pata trímeros)	Nektar	OJOONO3
20K, 4 brazos, Mal <sub>4</sub> (pata tetrámeros)	Nektar	OJOOPO4
40 K, 8 brazos, Mal <sub>8</sub> (pata octámeros)	Nektar	OJOOTO8

Se puede utilizar una amplia diversidad de químicas de acoplamiento para acoplar moléculas de polímeros a agentes terapéuticos de proteínas y péptidos. La elección de la química de acoplamiento más apropiada depende en gran medida del sitio de acoplamiento deseado. Por ejemplo, las siguientes químicas de acoplamiento se han utilizado unidas a uno o más de los extremos de las moléculas de PEG (Fuente: catálogo de 2003 de Nektar Molecular Engineering):

- N-maleimida
- Vinil sulfona
- Carbonato de benzotriazol
- Succinimidil propionato
- Succinimidil butanoato
- Tioéster
- Acetaldehídos
- Acrilatos
- Biotina
- Aminas primarias

Como se indicó anteriormente, los polímeros no basados en PEG también proporcionan enlazadores adecuados para multimerizar los TCR de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar fracciones que contienen extremos de maleimida unidos por cadenas alifáticas tales como BMH y BMOE (Pierce, N.º de producto 22330 y 22323).

La otra clase de enlazadores de TCR son los enlazadores peptídicos. Estos enlazadores están compuestos por cadenas de aminoácidos y funcionan para producir enlazadores simples o dominios de multimerización a los que se pueden unir las moléculas de TCR. El sistema de biotina/estreptavidina se ha utilizado anteriormente para producir tetrámeros de TCR (véase el documento WO/99/60119) para estudios de unión *in vitro*. Sin embargo, la estreptavidina es un polipéptido obtenido de microbios y, como tal, no es el más adecuado para su uso en un agente terapéutico.

Un complejo de TCR de la invención puede tener los TCR unidos por un enlazador peptídico derivado de un dominio de multimerización humano.

Hay varias proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que podría usarse en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha utilizado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpo scFv que mostraron una mayor persistencia en suero y una constante de disociación significativamente reducida, en comparación con el fragmento monomérico de scFv. (Willuda *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392). La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que podría utilizarse potencialmente para este tipo de aplicación.

Un complejo de TCR multivalente de la invención puede comprender al menos dos TCR, en donde al menos uno de dichos TCR está asociado con un agente terapéutico.

Un TCR (o un complejo multivalente del mismo) de la presente invención puede comprender como alternativa o adicionalmente una cisteína reactiva en el C-terminal o N-terminal de las cadenas alfa o beta del mismo.

*Uso diagnóstico y terapéutico*

El TCR de la invención puede estar asociado con un agente terapéutico o fracción detectable. Por ejemplo, dicho agente terapéutico o fracción detectable puede estar unido covalentemente al TCR.

Dicho agente terapéutico o fracción detectable puede estar unido covalentemente al extremo C de una o ambas cadenas del TCR.

El TCR<sub>mc</sub> de una o ambas cadenas del TCR<sub>d</sub> de los TCR de la presente invención pueden marcarse con una fracción detectable, por ejemplo, un marcador que sea adecuado para fines diagnósticos. Dichos TCR marcados son útiles en un método para detectar un complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201, cuyo método comprende poner en contacto el ligando del TCR con un TCR (o un complejo de TCR multimérico de alta afinidad) que es específico para

el ligando de TCR; y detectar la unión al ligando de TCR. En los complejos de TCR tetraméricos formados, por ejemplo, utilizando heterodímeros biotinilados, se puede usar estreptavidina fluorescente para proporcionar un marcador detectable. Dicho tetrámero de TCR marcado de forma fluorescente es adecuado para su uso en el análisis por FACS, por ejemplo, para detectar células presentadoras de antígeno que portan el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 para el cual estos TCR de alta afinidad son específicos.

Otra manera en la que los TCR solubles de la presente invención pueden detectarse es mediante el uso de anticuerpos específicos para el TCR, en particular anticuerpos monoclonales. Hay muchos anticuerpos anti-TCR disponibles en el mercado, tales como  $\alpha$ F1 y  $\beta$ F1, que reconocen los dominios constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.

Como alternativa o adicionalmente, un TCR (o un complejo multivalente del mismo) de la presente invención puede estar asociado (por ejemplo, covalentemente o vinculado de otra forma) un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, una fracción tóxica para su uso en la destrucción celular, o una molécula efectora inmunitaria tal como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede tener una capacidad de unión potenciada para un ligando de TCR, en comparación con un heterodímero no multimérico de tipo silvestre o receptor de células T de la invención. Por lo tanto, los complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención son particularmente útiles para rastrear o tener dirigirse a células que presentan complejos de SLYNTVATL-HLA-A\*0201 *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermediarios para la producción de complejos de TCR multivalentes adicionales que tengan tales usos. Estos TCR o complejos de TCR multivalentes pueden, por lo tanto, proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para uso *in vivo*.

Se describe un método para suministrar un agente terapéutico a una célula diana, método que comprende poner en contacto las células diana potenciales con un TCR o complejo de TCR multivalente en conformidad con la invención, en condiciones que permitan la unión del TCR o complejo de TCR multivalente a la célula diana, siendo dicho TCR o complejo de TCR multivalente específico para el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 y teniendo el agente terapéutico asociado a él.

En particular, el TCR soluble o complejo de TCR multivalente de la presente invención se puede usar para suministrar agentes terapéuticos al emplazamiento de las células que presentan un antígeno particular. Esto sería útil en muchas situaciones y, en particular, frente a células infectadas por el VIH. Se podría suministrar un agente terapéutico de forma que ejerza su efecto de forma local pero no solo sobre la célula a la que se une. Por lo tanto, una estrategia particular contempla moléculas citotóxicas o inmunoestimulantes unidas a los TCR o complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención específicos para el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201.

Se podrían emplear muchos agentes terapéuticos para este uso, por ejemplo, compuestos radiactivos, enzimas (por ejemplo, perforina) o agentes quimioterapéuticos (por ejemplo cis-platino). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejercen en el emplazamiento deseado, la toxina podría estar dentro de un liposoma unida a estreptavidina, de forma que el compuesto se libere lentamente. Esto evitará los efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y garantizará que la toxina tenga un efecto máximo después de la unión del TCR a las células presentadoras de antígeno pertinentes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de destruir células de mamífero que tienen un peso molecular de menos de 700 daltons. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos que tienen la capacidad de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Los ejemplos de tales agentes incluyen cis-platino, derivados de maitansina, rachelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, Porfímero de sodio Photofrin II, temozolmida, topotecán, glucuronato de trimetreato, auristatina E, vincristina y doxorubicina;
- citotoxinas peptídicas, es decir, proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de destruir células de mamífero. Incluyendo, pero sin limitación, ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de pseudomonas, ADNasa y ARNasa;
- radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se desintegran con la emisión simultánea de una o más de partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ , incluyendo, pero sin limitación, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astatina 213; se pueden usar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos a los TCR de alta afinidad, o multímeros de los mismos;
- profármacos, incluyendo, pero sin limitación, profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos;
- inmunoestimulantes, es decir, fracciones que estimulan la respuesta inmunitaria. Incluyendo, pero sin limitación, citocinas tales como IL-2 e IFN, superantígenos y mutantes de los mismos, fusiones de TCR-HLA y quimiocinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimulante del crecimiento del melanoma, etc., anticuerpo o fragmentos de los mismos, activadores del complemento, dominios proteicos xenogénicos, dominios proteicos alogénicos, dominios de proteínas víricas/bacterianas, péptidos víricos/bacterianos y

anticuerpos anti-determinantes de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD3 o anti-CD28) o análogos de anticuerpos tales como Nanobodies™ y Affybodies™.

5 Los TCR solubles o complejos de TCR multivalentes de la invención se pueden unir a una enzima que tenga la capacidad de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco solo en el sitio donde se precisa (es decir, dirigido por el TCRs).

10 Se espera que los TCR específicos para SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16)-HLA-A\*0201 de alta afinidad divulgados en el presente documento se puedan usar en métodos para el diagnóstico y tratamiento del SIDA.

15 Para el tratamiento, el emplazamiento del agente terapéutico en la vecindad de las células infectadas por el VIH (CD4+) potenciaría el efecto de las toxinas o los inmunoestimulantes. Para el suministro de la vacuna, el antígeno de vacuna podría emplazarse en la vecindad de las células presentadoras de antígeno, potenciando así la eficacia del antígeno. El método también se puede aplicar para fines de obtención de imágenes.

20 En el presente documento se describe una preparación de membranas que comprende un TCR de la invención. Dicha preparación de membranas puede prepararse a partir de células o puede comprender una membrana sintética.

25 La presente invención proporciona una célula que alberga un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. Por ejemplo, dicha célula puede ser un linfocito T.

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: un TCR o un complejo de TCR multivalente de la invención (opcionalmente, asociado con un agente terapéutico), o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable;

35 En el presente documento se describe un método de tratamiento del SIDA que comprende administrar a un sujeto que padece tal SIDA, una cantidad eficaz de un TCR o un complejo de TCR multivalente de la invención, o una preparación de membranas que comprende un TCR de la invención, o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. Se describe el uso de un TCR o un complejo de TCR multivalente de la invención, o una preparación de membranas que comprende un TCR de la invención, o una pluralidad de células que albergan un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, en la preparación de una composición para el tratamiento del SIDA. Se describen usos y métodos adicionales en donde el TCR, o complejo de TCR multivalente de la invención, o una preparación de membranas que comprende un TCR de la invención, se administra en una forma que está asociada con un agente terapéutico. Las células que albergan un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR de la invención pueden ser linfocitos T CD8+.

40 Los TCR terapéuticos o de obtención de imágenes generalmente se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril que, normalmente, incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un paciente). La inyección se puede proporcionar en una forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionará en un recipiente sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente incluiría (aunque no necesariamente) las instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

45 Sin pretender limitarse a teoría alguna, se espera que los TCR de la invención proporcionen agentes de direccionamiento eficaces que tengan la capacidad de suministrar agentes terapéuticos tales como inmunoestimulantes y/o agentes citotóxicos a células (CD4+) infectadas por VIH. En particular, se espera que la administración de los TCR de la presente invención, cuando esté asociada con inmunoestimulantes y/o agentes citotóxicos en combinación con terapias convencionales con fármacos antirretrovirus y/o tratamiento con IL-2, pueda dirigirse a las células infectadas por VIH.

50 La siguiente es un listado de los fármacos antirretrovíricos actualmente aprobados para su uso en los EE. UU.:

- 55 Agenerasa (amprenavir) - inhibidor de proteasas  
 Combivir -combinación de Retrovir (300 mg) y Epivir (150 mg)  
 Crixivan (indinavir) - inhibidor de proteasas  
 Epivir (3tc / lamivudina) - análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa  
 60 Epzicom (una combinación de 2 inhibidores nucleosídicos de la (los INRT, en la misma píldora; 600 mg de Ziagen (abacavir) y 300 mg of Epivir (3TC).  
 Emtriva [emtricitabina (FTC)]  
 Fortovase (saquinavir) - inhibidor de proteasas  
 Fuzeon (enfuvirtida) - Inhibidor de la fusión  
 65 Hivid (ddc / zalcitabina) - análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa  
 Invirase (saquinavir) - inhibidor de proteasas

Kaletra (lopinavir) - inhibidor de proteasas

Lexiva (Fosamprenavir) Inhibidor de proteasas aprobado el 20/10/03

Norvir (ritonavir) - inhibidor de proteasas

Rescriptor (delavirdina) - análogo no nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

5 Retrovir, AZT (zidovudina) - análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

Reyataz (atazanavir; BMS-232632) - inhibidor de proteasas

Sustiva (efavirenz) - análogo no nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

Trizivir (3 no nucleosídicos en un comprimido; abacavir + zidovudina + lamivudina

Truvada (Emtricitabina + Tenofovir DF)

10 Videx (ddl / didanosina) análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

Videx EC; (ddl / didanosina) análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa;

Viracept (nelfinavir) - inhibidor de proteasas

Viramune (nevirapina) - análogo no nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

15 Viread (tenofovir disoproxil fumarato) análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa (de tipo

Adenosine)

Zerit (d4t / stavudina) - análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

Ziagen (abacavir) - análogo nucleosídico inhibidor de la transcriptasa inversa

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

25 Las dosificaciones de las sustancias de la presente invención pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo a tratar, etc., y un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas a utilizar.

#### Aspectos adicionales

30 Un TCR $\alpha$  o TCR $\beta$  (que preferentemente está constituido por secuencias constantes y variables correspondientes a secuencias humanas) de la presente invención puede proporcionarse en forma sustancialmente pura, o como una preparación purificada o aislada. Por ejemplo, puede proporcionarse en una forma que esté sustancialmente libre de otras proteínas.

35 La secuencia (o secuencias) del ácido nucleico o de los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la invención pueden modificarse para optimizar el nivel de expresión obtenido en la célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota apropiada. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula de *E. coli* o un linfocito T humano. Las modificaciones hechas a estas secuencias genéticas son silenciosas, es decir, no modifican la secuencia de aminoácidos codificada. Hay varias empresas que ofrecen tales servicios de optimización de expresión, incluyendo, GeneArt, Alemania.

45 Se describe en el presente documento un método de producción de un TCR de alta afinidad que tiene la propiedad de unirse a SLYNTVATL-HLA-A\*0201. CARACTERIZADO POR QUE el TCR (i) comprende al menos un dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR y/o al menos un dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR y (ii) tiene una  $K_D$  para dicho complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 de menos de o igual a  $1 \mu\text{M}$  y/o una constante de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) para el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o más baja, en donde el método comprende:

50 (a) la producción de un TCR que comprende los dominios variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para Gag del VIH parental, en donde uno o ambos de dominios variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  comprenden una mutación (o mutaciones) en uno o más de los aminoácidos identificados en las reivindicaciones 7 y 8;

(b) poner en contacto dicho TCR mutado con SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en condiciones adecuadas para permitir la unión del TCR a SLYNTVATL-HLA-A\*0201;

55 y medir la  $K_D$  y/o la  $k_{\text{off}}$  de la interacción.

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

#### Ejemplos

60 La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, que no limiten el alcance de la invención de ningún modo.

A continuación, se hace referencia a los siguientes dibujos adjuntos, en las cuales:

65

## ES 2 699 320 T3

- La Figura 1a y 1b detallan las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa y del dominio variable de la cadena beta del TCR para Gag del VIH, respectivamente.
- 5 Las Figuras 2a y 2b muestran respectivamente la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para Gag parental.
- Las Figuras 3a y 3b muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para Gag del VIH producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 2a y 2b.
- 10 Las figuras 4a y 4b muestran respectivamente la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para Gag del VIH mutadas para codificar restos de cisteína adicionales para formar un enlace disulfuro no nativo. El codón mutado se indica mediante un sombreado y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción introducidos están subrayados.
- 15 Las Figuras 5a y 5b muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para Gag del VIH producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b. La cisteína introducida en cada cadena se indica mediante un sombreado.
- 20 La Figura 6 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de las variantes de alta afinidad del TCR para Gag del VIH.
- La Figura 7 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de las variantes de alta afinidad del TCR para Gag del VIH.
- 25 La Figura 8a detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRAC.
- La Figura 8b detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRBC1.
- La Figura 8c detalla la secuencia de aminoácidos de una porción soluble de TRBC2.
- 30 La Figura 9 detalla la secuencia de ADN del plásmido pEX954.
- La Figura 10 detalla la secuencia de ADN del plásmido pEX821.
- 35 La Figura 11 detalla las secuencias de aminoácidos de la cadena beta de la variante de TCR para Gag del VIH soluble parental fusionada a través de un enlazador peptídico a IL-2 humana de tipo silvestre. Los aminoácidos del enlazador y de IL-2 se indican en cursiva.
- 40 La Figura 12 proporciona las curvas de respuesta de Biacore generadas para la interacción del TCR para Gag del VIH parental unido por disulfuro soluble y el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201.
- La Figura 13 proporciona un mapa plasmídico del plásmido pEX954.
- 45 La Figura 14 proporciona un mapa plasmídico del plásmido pEX821.
- La Figura 15a proporciona la secuencia de ADN de longitud completa de la cadena  $\alpha$  del TCR Gag del VIH parental optimizada para la expresión en linfocitos T humanos.
- 50 La Figura 15b proporciona la secuencia de ADN de longitud completa de la cadena  $\beta$  del TCR Gag del VIH parental optimizada para la expresión en linfocitos T humanos.
- La Figura 16a proporciona la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena  $\alpha$  del TCR para Gag del VIH parental.
- 55 La Figura 16b proporciona la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena  $\beta$  del TCR Gag del VIH parental optimizada para la expresión en linfocitos T humanos.
- La Figura 17a proporciona datos de análisis por FACS para linfocitos T CD8+ de control no transducidos.
- 60 La Figura 17b proporciona datos de análisis por FACS que demuestran la expresión del TCR para Gag del VIH parental en la superficie de linfocitos T CD8+ transducidos.
- Las Figuras 18a y 18b proporcionan las secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa y beta de un TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unido por disulfuro soluble, respectivamente.
- 65

La Figura 19 demuestra la capacidad de los TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unidos por disulfuro solubles para inhibir la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en presencia de linfocitos To infectados con VIH, medido por la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ .

5 La Figura 20 demuestra la capacidad de los TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unidos por disulfuro solubles para inhibir la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en presencia de linfocitos To no infectados pulsados con péptido SLYNTVATL, medido por la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ .

10 La Figura 21 demuestra la capacidad de los TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unidos por disulfuro solubles para teñir linfocitos T2 pulsados con péptido SLYNTVATL.

*Ejemplo 1 - Producción de TCR unidos por disulfuro solubles que comprenden las regiones variables del TCR para Gag del VIH parental*

15 Las Figuras 4a y 4b proporcionan las secuencias de ADN de las cadenas alfa beta unidas por disulfuro solubles de un TCR parental que es específico para el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201. Varias compañías de investigación por contrato pueden sintetizar *de novo* estas secuencias de ADN, por ejemplo, GeneArt (Alemania). También se añaden a estas secuencias de ADN sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para facilitar el ligamiento de estas secuencias de ADN en los plásmidos de expresión basados en pGMT7, que contienen el promotor T7 para una expresión de alto nivel en la cepa BL21-DE3 (pLysS) de *E. coli* (Pan *et al.*, Biotechniques (2000) 29 (6): 1234-8)

20 Las secuencias de la cadena alfa de TCR contienen sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Clal* y *Salll* introducidos y esta secuencia se ligó en pEX954 (véanse las Figuras 9 y 13) cortado con *Clal* y *XhoI*.

25 Las secuencias de la cadena beta de TCR contienen sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *AseI* y *AgeI* introducidos y se ligaron en pEX821 (véanse las Figuras 10 y 14) cortado con *NdeI/Agel*.

*Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción como se introdujeron en el ADN que codifica las cadenas de TCR*

<i>Clal</i> -	ATCGAT
<i>Salll</i> -	GTCGAC
<i>AseI</i> -	ATTAAT
<i>AgeI</i> -	ACCGGT

*Ligamiento*

30 El ADN cortado de las cadenas alfa y beta de TCR y el vector cortado se ligaron utilizando un kit de ligamiento rápido de ADN (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

35 Los plásmidos ligados se transformaron en células *E. coli* cepa XL1-blue competentes y se sembraron en placas de LB/agar que contenían ampicilina 100 mg/ml. Después de la incubación durante una noche a 37 °C, se tomaron colonias individuales y se cultivaron en 10 ml de LB que contenía ampicilina 100 mg/ml durante una noche a 37 °C con agitación. Los plásmidos clonados se purificaron utilizando un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuenció utilizando un secuenciador de ADN automatizado (Lark Technologies).

40 Las Figuras 5a y 5b muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR para gag del VIH parental unidas por disulfuro producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b

*Ejemplo 2- Producción de variantes de alta afinidad del TCR para Gag del VIH unido por disulfuro soluble*

45 El TCR para Gag del VIH nativo unido por disulfuro soluble producido como se describe en el Ejemplo 1 puede usarse como un molde a partir del cual se producen los TCR de la invención que tienen una afinidad aumentada por el complejo SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16) -HLA-A\*0201.

50 La presentación en fagos es un medio por el cual pueden generarse bibliotecas de variantes de TCR para Gag del VIH para identificar mutantes de alta afinidad. Por ejemplo, la presentación en fagos del TCR y los métodos de exploración descritos en (Li *et al.*, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) se puede adaptar y aplicar a los TCR para Gag del VIH.

55 Las secuencias de amino de los dominios variables de las cadenas alfa y beta de TCR mutados que, cuando se combinan con una cadena de TCR apropiada, demuestran una alta afinidad por el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201, se enumeran en las Figuras 6 y 7, respectivamente. (las SEQ ID NO: 11-13 y 14-15, respectivamente).

Como saben los expertos en la materia, los cambios de codones necesarios para producir estas cadenas mutadas pueden introducirse en el ADN que codifica estas cadenas mediante mutagénesis dirigida. (kit de mutagénesis dirigida QuickChange™ de Stratagene)

5 En resumen, esto se logra usando cebadores que incorporan el cambio (o cambios) de codón deseado y los plásmidos que contienen el ADN de la cadena de TCR pertinente como un molde para la mutagénesis:  
La mutagénesis se llevó a cabo en las siguientes condiciones: plásmido de molde 50 ng, 1 µl de dNTP 10 mM, 5 µl de tampón de ADN polimerasa Pfu 10x suministrado por el fabricante, 25 pmoles de cebador directo, 25 pmoles de cebador inv., 1 µl de ADN polimerasa pfu en un volumen total de 50 µl. Después de una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C, la reacción se sometió a 25 ciclos de desnaturalización (95 °C, 10 segundos), apareamiento (55 °C 10 segundos) y elongación (72 °C, 8 minutos). El producto resultante se digirió con la enzima de restricción DpnI para eliminar el plásmido de molde y se transformó en *E. coli* cepa XL1-blue. La mutagénesis se verificó por secuenciación.

### 15 *Ejemplo 3 - Expresión, replegamiento y purificación de TCR soluble*

Los plásmidos de expresión que contenían la cadena α y la cadena β mutadas, respectivamente, como se prepararon en los Ejemplos 1 o 2, se transformaron por separado en *E. coli* cepa BL21pLysS y se cultivaron colonias individuales resistentes a ampicilina a 37 °C en medio TYP (ampicilina 100 µg/ml) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,4, antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron tres horas posinducción mediante centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en un Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, sacarosa al 25 % (p/v), EDTANA 1 mM, AzidaNa al 0,1 % (p/v), DTT 10 mM, pH 8,0. Después de una etapa de congelación y descongelación durante una noche, las células resuspendidas se sometieron a ultrasonidos en ráfagas de 1 minuto durante un total de aproximadamente 10 minutos en un sonicador Milsonix XL2020, utilizando una sonda convencional de 12 mm de diámetro. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después, se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y los componentes de la membrana. Cada vez el sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizó en tampón Triton (Tris-HCl 50 mM, Triton X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, EDTANA 10 mM, AzidaNa al 0,1 % (p/v), DTT 2 mM, pH 8,0) antes de sedimentarlos por centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en una Beckman J2-21. Después, se eliminaron el detergente y la sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM, EDTANA 1 mM, AzidaNa al 0,1 % (p/v), DTT 2 mM, pH 8,0. Por último, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento de la proteína del cuerpo de inclusión se cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y midiendo con el ensayo de unión a colorante de Bradford (PerBio).

Aproximadamente 30 mg de cadena β de TCR y 60 mg de cadena α de TCR de cuerpos de inclusión solubilizados se descongelaron de las reservas congeladas, después se mezclaron las muestras y la mezcla se diluyó en 15 ml de una solución de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, acetato de sodio 10 mM, EDTA 10 mM), para garantizar la desnaturalización completa de las cadenas. La solución de guanidina conteniendo las cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas se inyectó después en 1 litro del siguiente tampón de replegamiento: Tris 100 mM pH 8,5, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, urea 5 M, PMSF 0,2 mM. La pareja de oxidorreducción (2-mercaptoetilamina y cistamina (hasta concentraciones finales de 6,6 mM y 3,7 mM, respectivamente) se añadieron aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La solución se dejó durante 5 horas ± 15 minutos. El TCR replegado se dializó en una membrana Spectrapor 1 (Spectrum; N.º de producto 132670) frente a 10 l de Tris 10 mM pH 8,1 a 5 °C ± 3 °C durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió a Tris 10 mM recién preparado, pH 8,1 (10 l) y la diálisis se continuó a 5 °C ± 3 °C durante otras 20-22 horas.

El TCRs se separó de los productos de degradación y las impurezas cargando el replegamiento dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl de 0-500 mM con 50 volúmenes de columna utilizando un purificador Akta (Pharmacia). Las fracciones pico se almacenaron a 4 °C y se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie antes de agruparlas y concentrarlas. Por último, el TCRs se purificó y caracterizó utilizando una columna de filtración en gel Superdex 200HR preequilibrada en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,5 mM, nonidet p40 al 0,05 %). El pico de elución a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se agrupó y concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón superficial BIAcore.

### 60 *Ejemplo 4 - Caracterización por resonancia de plasmón de superficial Biacore de la unión del TCRs a un pMHC específico*

Se utilizó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (Biacore 3000™) para analizar la unión del TCRs a su ligando péptido-MHC. Esto se facilitó mediante produciendo complejos de pMHC individuales (descritos a continuación) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de un modo semiorientado, permitiendo un análisis eficaz de la unión de un receptor de linfocitos T soluble a hasta cuatro pMHC distintos (inmovilizados en celdas de flujo separadas) de forma simultánea. La inyección manual del complejo de HLA permite manipular fácilmente el nivel preciso de moléculas de clase I inmovilizadas.

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

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purificaron hasta aproximadamente el 80 % de pureza. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturizó en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, y se replegó a una concentración de 30 mg/litro de cadena pesada,  $\beta 2$  30 mg/mitro en L-Arginina-HCl 0,4 M, Tris 100 mM pH 8,1, cistamina 3,7 mM,  $\beta$ -cisteamina 6,6 mM, 4 mg/ml del péptido SLYNTVATL necesario para cargarse en la molécula HLA-A\*0201, por la adición de un único pulso de proteína desnaturizada en un tampón de replegamiento a < 5 °C. Se permitió que el replegamiento finalizara a 4 °C durante al menos 1 hora.

El tampón se cambió por diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM, pH 8,1. Fueron necesarios dos cambios de tampón para reducir suficientemente la fuerza iónica de la solución. La solución de proteína se filtró después a través de un filtro de acetato de celulosa de 1,5  $\mu$ m y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ (8 ml de volumen de lecho). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM. El complejo HLA-A\*0201-péptido se eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM y se recogieron las fracciones pico, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Se les cambió el tampón a las moléculas de pMHC etiquetadas con biotinilación a tampón Tris 10 mM, pH 8,1, NaCl 5 mM usando una columna de desalado rápido de Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteína se enfriaron en hielo y se añadió cóctel inhibidor de proteasas (Calbiochem). Después se añadieron los reactivos de biotinilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8), MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM y enzima BirA 5  $\mu$ g/ml (purificada de acuerdo con O'Callaghan *et al.* (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Después, la mezcla de reacción se dejó incubar en agitación a temperatura ambiente durante una noche.

Las moléculas de pHLA-A\*0201 biotiniladas se purificaron utilizando cromatografía por filtración en gel. Una columna Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 se preequilibró con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción de biotinilación y la columna se hizo progresar con PBS a 0,5 ml/min. Las moléculas de pHLA-A\*0201 biotiniladas eluyeron como un único pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se agruparon, se enfriaron en hielo y se añadió cóctel inhibidor de proteasas. La concentración de proteína se determinó utilizando un ensayo de unión de Coomassie (PerBio) y se almacenaron alícuotas de las moléculas de pHLA-A\*0201 biotiniladas congeladas a -20 °C. La estreptavidina se inmovilizó mediante métodos de acoplamiento de amina convencionales.

Dichos complejos inmovilizados tienen la capacidad de unirse tanto a los receptores de linfocitos T como al correceptor CD8 $\alpha$ , los cuales pueden inyectarse en la fase soluble. La unión específica del TCR se obtiene incluso a bajas concentraciones (al menos 40  $\mu$ g/ml), lo que implica que el TCR es relativamente estable. Se observa que las propiedades de unión al pMHC de los TCRs son cualitativa y cuantitativamente similares si los TCRs se usa en la fase soluble o inmovilizada. Este es un control importante para la actividad parcial de las especies solubles y también sugiere que los complejos de pMHC biotinilados son biológicamente tan activos como los complejos no biotinilados.

Las interacciones entre los TCRs del Gag del VIH que contiene un nuevo enlace intercadena y su complejo ligando/MHC, o una combinación de HLA-péptido irrelevante, cuya producción se describe anteriormente, se analizaron en un biosensor de resonancia de plasmón superficial (RPS) Biacore 3000™. La RPS mide los cambios en el índice de refracción, expresados en unidades de respuesta (UR), cerca de la superficie de un sensor dentro de una celda de flujo pequeña, un principio que puede usarse para detectar las interacciones de los ligandos del receptor y para analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Las celdas de flujo de la sonda se prepararon inmovilizando los complejos HLA-péptido individuales en celdas de flujo distintas a través de la unión entre la biotina reticulada en  $\beta 2$  y la estreptavidina que se ha reticulado químicamente a la superficie activada de las celdas de flujo. Después, el ensayo se realizó pasando los TCRs sobre las superficies de las distintas celdas de flujo a un caudal constante, midiendo la respuesta de RPS al hacerlo.

#### *Para medir la constante de unión en equilibrio*

Se prepararon diluciones seriadas de los TCRs para Gag del VIH parental o mutado y se inyectaron a una caudal constante de 5  $\mu$ l min<sup>-1</sup> sobre dos celdas de flujo distintas; una recubierta con ~1000 UR del complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201 específico, y la segunda recubierta con ~1000 UR del complejo HLA-A2-péptido no específico. La respuesta se normalizó para cada concentración utilizando la medición de la celda de control. Los datos normalizados de la respuesta se representaron frente a la concentración de la muestra de TCR y se ajustaron a una

hipérbola para calcular la constante de unión en equilibrio,  $K_D$ . (Price y Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª Edición) 1979, Clarendon Press, Oxford).

*Para medir parámetros cinéticos*

5 Para los TCR de alta afinidad, se determinó  $K_D$  midiendo experimentalmente la constante de disociación,  $k_d$ , y la constante de asociación,  $k_a$ . La constante en equilibrio  $K_D$  se calculó como  $k_d/k_a$ .

10 El TCR se inyectó en dos celdas distintas, una recubierta con -300 UR de complejo HLA-A2-péptido nyeso específico, y la segunda recubierta con -300 UR del complejo HLA-A2-péptido no específico. El caudal se fijó a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Normalmente, se inyectaron 250  $\mu\text{l}$  de TCR a una concentración de -3  $\mu\text{M}$ . El tampón se hizo fluir hasta que la respuesta volvió a los valores basales. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el software Biaevaluation. La fase de disociación también se ajustó a una única ecuación de caída exponencial, lo que permite el cálculo de la semivida.

15 *Resultados*

20 Se analizó la interacción entre el TCR para Gag del VIH nativo unido por disulfuro soluble (que consiste en las cadenas de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  detalladas en las SEQ ID NO 9 y 10, respectivamente) y el complejo SLYNTVATL-HLA-A\*0201, utilizando los métodos anteriores, y se demostró una  $K_D$  de 85 nM y una tasa de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) de  $2,21 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ . (Véase la Figura 12 para las curvas de respuesta de Biacore)

Los TCR especificados en la siguiente tabla tienen una  $K_D$  menor o igual a 1  $\mu\text{M}$  y/o una  $k_{\text{off}}$  de  $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$  o menor.

Secuencia del dominio variable de la cadena alfa, SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de la cadena beta, SEQ ID NO:
1	2
1	14
1	15
11	2
12	2
13	2
12	15
13	15
12	14
13	14

25 *Ejemplo 5 - Producción de una proteína de fusión de IL-2 humana de TS-TCR para Gag del VIH de alta afinidad soluble*

30 Se pueden usar los métodos sustancialmente como se describen en los Ejemplos 1 a 3 para producir una proteína de fusión de IL-2 humana de TS-TCR para Gag del VIH de alta afinidad soluble: En resumen, los ADN que codifican el enlazador deseado y la IL-2 humana de TS se añaden en el extremo 3' de la secuencia de ADN de la cadena beta del TCR para Gag del VIH parental unida por disulfuro soluble inmediatamente antes del codón TAA ("Stop"). La Figura 11 proporciona la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende una cadena beta de TCR para Gag del VIH parental unida por disulfuro fusionada a IL-2 humana de TS a través de una secuencia enlazadora. (SEQ ID NO: 24) El enlazador y la porción de IL-2 de esta proteína de fusión se indican en cursiva. 35 Después, el ADN que codifica esta construcción se puede ligar a pEX821. La proteína de fusión TCR para Gag del VIH-IL-2 parental soluble puede expresarse después, combinando esta proteína de fusión de la cadena beta con la cadena del TCR de la cadena alfa para Gag del VIH parental unida por disulfuro soluble que se detalla en la Figura 5a (SEQ ID NO: 9), utilizando sustancialmente los métodos como se describen en el Ejemplo 3.

40 *Ejemplo 6 - Expresión recombinante del TCR para Gag del VIH parental en la superficie de los linfocitos T.*

45 Se sintetizaron construcciones de ADN que codifican la secuencia señal, los dominios extracelulares, transmembrana e intracelular de las cadenas del TCR para Gag del VIH parentales (GeneArt, Alemania). Estas secuencias de ADN de la cadena  $\alpha$  del TCR y de la cadena  $\beta$  del TCR, proporcionadas en las Figuras 15a y 15b respectivamente, se modifican a partir de las secuencias de ADN del TCR para Gag del VIH parentales para

potenciar los niveles de expresión de las cadenas de TCR codificadas en linfocitos T humanas, mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Las Figuras 16a y 16b proporcionan las secuencias de aminoácidos de longitud completa codificadas por las secuencias de ADN de las Figuras 15a y 15b, respectivamente.

5 Después, las secuencias de ADN de la cadena  $\alpha$  del TCR y de la cadena  $\beta$  del TCR se insertaron juntas en un vector de expresión lentivírico. Este vector contiene ADN que codifica tanto la cadena  $\alpha$  como la cadena  $\beta$  del TCR para Gag del VIH parentales como una única fase de lectura abierta con la secuencia de aminoácidos en fase del factor de escisión de 2A del virus la fiebre aftosa (VFA) (LLNFDLLKLAGD-VESNPG (SEQ ID NO: 31)) separando las cadenas del TCR. (de Felipe *et al.*, Genet Vaccines Ther (2004) 2 (1): 13). En la traducción del ARNm, la cadena  $\alpha$  del TCR se produce con la secuencia peptídica de 2A en su extremo C y la cadena  $\beta$  del TCR se produce como un polipéptido separado.

15 Se transdujeron linfocitos T con el vector lentivírico anterior. En resumen, se estimularon linfocitos T primarios durante 24 horas usando perlas anti-CD3/anti-CD28. Después se incubó con los linfocitos T estimulados un sobrenadante concentrado de lentivirus, que expresaba los genes del TCR, para permitir la transducción vírica. Después, se retiraron las perlas anti-CD3/anti-CD28 y se cultivaron los linfocitos T transducidos hasta que alcanzaron un "volumen de reposo" de 200-300 fl.

20 La presentación de los TCR para Gag del VIH en la superficie de las células transducidas se confirmó mediante análisis por FACS utilizando el tetrámero HLA-A\*0201-SLYNTVALT PE y cotinción con anticuerpo monoclonal anti-CD8 FITC.

#### Resultados

25 La Figura 17b proporciona datos de análisis por FACS que demuestran la expresión satisfactoria del TCR para Gag del VIH parental en la superficie de linfocitos T CD8+ transducidos. La Figura 17a proporciona datos de análisis por FACS generados usando linfocitos T no transducidos de control.

#### 30 Ejemplo 7 - Inhibición de la activación de CTL por los TCR para Gag del VIH de alta afinidad solubles

Los siguientes ensayos se llevaron a cabo para demostrar que el TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble tenía la capacidad de inhibir la activación de una línea de linfocitos T policlonal reactiva a SLYNTVATL-HLA-A\*0201.

#### 35 Inhibición de la activación de la línea de linfocitos T policlonal reactivas a SLYNTVATL-HLA-A\*0201 OX84 en presencia de células infectadas por VIH

40 El TCR para Gag del VIH de alta afinidad c11c6 soluble utilizado en este experimento contenía el dominio variable de la cadena alfa del TCR y las regiones variables de la cadena beta del TCR mostrados en la Figura 6c (SEQ ID NO: 13) y la Figura 7b (SEQ ID NO: 15), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos completas de las cadenas alfa y beta del TCR de este TCR soluble se proporcionan en la Figura 18a (SEC ID NO: 29) y la Figura 18b (SEC ID NO: 30), respectivamente.

45 La producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se usó como lecturas para la activación de CTL.

#### Reactivos

50 Medio de ensayo R10: SFT al 10 % (inactivado por calor, Gibco, n.º de cat. 10108-165), RPMI 1640 (Gibco, n.º de cat. 42401-018) al 88 %, glutamina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 25030-024) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 15070-063).

Péptido: (obtenido de varias fuentes) inicialmente disuelto en DMSO (Sigma, n.º de cat. D2650) a 4 mg/ml y congelado.

55 El kit BD™ Cytometric Bead Array, kit de citocinas Th1/Th2 humanas II (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.) contiene todos los reactivos necesarios para el ensayo.

#### Ensayo de activación de linfocitos T

60 Se lavaron células diana To infectadas de forma crónica con VIH (cepas de laboratorio HXB2 y VIH3B) y se volvieron a suspender en medio R10. Como control no infectado, se pulsaron células diana To con 1 nM del péptido SLYNTVATL, durante 30 minutos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

#### Muestras de prueba:

65 25.000 células diana To infectadas con VIH en medio R10 por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U.

TCR para Gag del VIH c11c6o de alta afinidad  $2 \times 10^{-7}$  M o TCR para Gag del VIH parental en medio R10 por pocillo.

5000 células de la línea de linfocitos T efectores policlonal OX84 en medio R10 por pocillo.

Controles:

Como anteriormente, se sustituyen los TCR solubles irrelevantes (los TCR específicos para HLA-A\*0201-Tax y específicos para HLA-A\*0201-NY-ESO ) o los TCR para Gag de VIH de alta afinidad.

Después, la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. El sobrenadante del cultivo se retiró para medir los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  presentes, utilizando el siguiente método.

*Ensayo de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$*

Se prepararon perlas citométricas de BD™ recubiertas con (a) anticuerpos de captura anti-IFN $\gamma$  y (b) anticuerpos de captura anti-TNF $\alpha$  de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después, se prepararon varios tubos de ensayo que contenían los siguientes añadidos

50  $\mu$ l de perlas citométricas de BD™ anti-IFN $\gamma$  y anti-TNF $\alpha$  mezcladas en diluyente de ensayo de BD  
50  $\mu$ l de reactivo de detección de BD

Seguido de:

50  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo tomado de los pocillos del ensayo de activación de linfocitos T. (Muestras de prueba)  
O

50  $\mu$ l de patrones de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  mezclados preparados en variedad de concentraciones por dilución seriada de los patrones de reserva. (Patrones de calibración)

Después, los tubos se incubaron en la oscuridad durante 3 horas antes de lavarse con 1 ml de tampón de lavado BD y se centrifugaron. Por último, las perlas se resuspendieron en 300  $\mu$ l del tampón de lavado y el nivel de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  presente se determinó mediante citometría de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

*Inhibición de la línea T policlonal OX84 específica para SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en presencia de células To no infectadas pulsadas con péptido SLYNTVATL*

Se usaron los mismos reactivos y métodos que se utilizaron para el ensayo de activación de CTL anterior, excepto que:  
Se usaron 2000 linfocitos T efectores policlonales OX84 en cada ensayo de activación de linfocitos T.

Como células diana se usaron células linfoblastoides To no infectadas, pulsadas con péptido SLYNTVATL  $10^{-10}$  - $10^{-8}$  M.

*Resultados*

El TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble inhibió fuertemente la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en presencia de linfocitos To infectados por VIH, medido por la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ . (Véase la figura 19)

El TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble inhibió fuertemente la activación de la línea de linfocitos T policlonal OX84 reactiva con SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en presencia de linfocitos To no infectados pulsados con SLYNTVATL, medido por la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ . (Véase la figura 20)

*Ejemplo 8 - Cuantificación de los antígenos de superficie celular SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en células T2 pulsadas con péptido mediante microscopía de fluorescencia usando TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad*

Se determinó el número de antígenos SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en células linfoblastoides T2 pulsadas con péptido (suponiendo que una señal de fluorescencia se relaciona con un único TCR marcado unido a su ligando pMHC afín en la superficie de la célula diana) por microscopía de fluorescencia de una sola molécula usando un TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad soluble. Esto se facilitó utilizando TCR biotinilado para dirigirse a células cancerosas que expresan antígeno y el posterior marcado del TCR unido a la célula mediante los conjugados de estreptavidina-Phycoerythrin R (PE). Después, se obtuvieron imágenes de las moléculas de PE individuales mediante microscopía de fluorescencia tridimensional.

Las células linfoblastoides T2 se pulsaron con el péptido SLYNTVATL derivado de Gag del VIH, o un péptido irrelevante (SLLMWITQC), en un intervalo de concentraciones ( $10^{-5}$  -  $10^{-10}$  M) durante 90 minutos a 37 °C. Después de pulsar, las células se lavaron dos veces con 500  $\mu$ l de PBS. Las células se incubaron en 200  $\mu$ l de solución de TCR (TCR para Gag del HIV c11c6 de alta afinidad 100 nM), en PBS. albúmina BSA al 0,5 %) durante 30 min a temperatura ambiente. La solución de TCR se retiró y las células se lavaron tres veces con 500  $\mu$ l de PBS. Las células se incubaron en 200  $\mu$ l de solución de estreptavidina-PE (5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de estreptavidina-PE en PBS que contenía BSA al 0,5 %) a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min. Se retiró la solución de estreptavidina-PE y las células se lavaron tres veces con 500  $\mu$ l de PBS. Se retiró el medio de lavado y las células se mantuvieron en 400  $\mu$ l de R10, sin rojo fenol, antes de obtener imágenes por microscopía de fluorescencia.

*Microscopía de fluorescencia.* La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo utilizando un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) con un objetivo de aceite de 63x (Zeiss). Se usó una fuente de luz Lambda LS que contenía una lámpara de arco de xenón de 300 W (Sutter) para la iluminación, y la intensidad de la luz se redujo a niveles óptimos colocando un filtro de densidad neutro de 0,3 y 0,6 en la trayectoria de la luz. Los espectros de excitación y emisión se separaron utilizando un conjunto de filtros TRITC/Dil (Chroma). Se obtuvieron imágenes en tres dimensiones de las células mediante la adquisición por apilamiento Z (21 planos, con 1  $\mu$ m de separación). La adquisición y el análisis de imágenes se realizaron con el programa informático Metamorph (Universal Imaging) como se describe (Irvine *et al.*, Nature 419: pág. 845-9 y Purbhoo *et al.*, Nature Immunology 5: pág. 524-30).

### Resultados

Como se muestra en la Figura 21, el método anterior se utilizó de forma satisfactoria para obtener imágenes del TCR para Gag del VIH c11c6 de alta afinidad unido a antígenos SLYNTVATL-HLA-A\*0201 en la superficie de los linfocitos T2 pulsados con péptido. Estos resultados muestran que el umbral para el recuento de epítomos en células pulsadas con péptido SLYNTVATL utilizando el TCR para Gag del VIH c6c11 de alta afinidad es aproximadamente péptido  $10^{-9}$  M.

### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Immunocore Ltd
- <120> Receptores de linfocitos T para el VIH de alta afinidad
- <130> 74/MG
- <140> PCT/GB2006/001147
- <141> 29-03-2006
- <150> GB 0506760.8
- <151> 01-04-2005
- <150> GB 0516487.6
- <151> 10-08-2005
- <160> 41
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 699 320 T3

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Thr Asn  
 85 90 95

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

Pro His

<210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 699 320 T3

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe  
35 40 45

Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg  
50 55 60

Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn  
65 70 75 80

Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Asp  
85 90 95

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

Thr

<210> 3  
<211> 624  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> ADN que codifica una porción truncada de la cadena alfa del TCR para GAG parental

<400> 3

atggcccaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttcaga gggagccatt 60  
gcctctctca attgcactta cagtgaccga ggttcccagt ccttctctg gtacagacaa 120  
tattctggga aaagccctga gttgataatg ttcatatact ccaatggtga caaagaagat 180  
ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtata tttccctgct catcagagac 240  
tccaagctca gtgattcagc cacctacctc tgtgcggtgc gcacaaattc cgggtatgca 300  
ctcaacttcg gcaaaggcac ctcgctggtg gtcacacccc atatccagaa ccctgaccct 360  
gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 420  
tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 480

ES 2 699 320 T3

	actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac	540
	aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc	600
	ttccccagcc cagaaagttc ctaa	624
5	<210> 4 <211> 732 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ADN que codifica una porción truncada de la cadena beta del tcr para gag parental	
	<400> 4	
	atggaggctg gagtcacaca aagtcccaca cacctgatca aaacgagagg acagcaagtg	60
	actctgagat gctctcctaa gtctgggcat gacactgtgt cctggtacca acaggccctg	120
	ggtcaggggc cccagtttat ctttcagtat tatgaggagg aagagagaca gagaggcaac	180
	ttccctgata gattctcagg tcaccagttc cctaactata gctctgagct gaatgtgaac	240
	gccttgttgc tgggggactc ggccctctat ctctgtgcca gcagcgacac cgtctcctac	300
	gagcagtact tcggggccggg caccaggctc acggtcacag aggacctgaa aaacgtgttc	360
	ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc	420
	acactgggtg gcctggccac aggcttctac cccgaccacg tggagctgag ctgggtgggtg	480
	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagacccgc agcccctcaa ggagcagccc	540
	gccctcaatg actccagata cgctctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg	600
	caggaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	660
	gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggccctggggt	720
	agagcagact aa	732
15	<210> 5 <211> 207 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> una porción truncada de la cadena alfa del tcr para gag parental	
	<400> 5	

ES 2 699 320 T3

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Thr Asn  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 6  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> una porción truncada de la cadena beta del tcr para gag parental

ES 2 699 320 T3

<400> 6

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe  
35 40 45

ES 2 699 320 T3

Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg  
50 55 60

Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn  
65 70 75 80

Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Asp  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Asp

<210> 7

<211> 630

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica una porción truncada de la cadena alfa del tor para gag parental que incluye un codón de Cys introducido y secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción

<400> 7

ES 2 699 320 T3

ccatcgatgg cccagaagga ggtggagcag aattctggac ccctcagtgt tccagagggga 60  
gccattgcct ctctcaattg cacttacagt gaccgaggtt cccagtcctt cttctgggtac 120  
agacaatatt ctgggaaaag ccctgagttg ataatgttca tatactccaa tggtgacaaa 180  
gaagatggaa ggtttacagc acagctcaat aaagccagcc agtatatttc cctgctcatc 240  
agagactcca agctcagtga ttcagccacc tacctctgtg cgggtgcgcac aaattccggg 300  
tatgcactca acttcggcaa aggcacctcg ctggttggtca caccctatat ccagaacct 360  
gaccctgccg tgtaccagct gagagactct aagtcgagtg acaagtctgt ctgcctattc 420  
accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 480  
gacaaatgtg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 540  
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 600  
accttcttcc ccagcccaga aagttcctaa 630

5 <210> 8  
<211> 742  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> ADN que codifica una porción truncada de la cadena beta del tcr para gag parental que incluye un codón de Cys introducido y secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción

<400> 8

tctctcatta atggaggctg gagtcacaca aagtcccaca cacctgatca aaacgagagg 60  
acagcaagtg actctgagat gctctcctaa gtctgggcat gacactgtgt cctggtacca 120  
acaggccctg ggtcaggggc cccagtttat ctttcagtat tatgaggagg aagagagaca 180  
gagaggcaac ttccctgatc gattctcagg tcaccagttc cctaactata gctctgagct 240  
gaatgtgaac gccttgttgc tgggggactc ggccctctat ctctgtgcc a gcagcgacac 300  
cgtctcctac gagcagtagt tcggggccggg caccaggctc acggtcacag aggacctgaa 360  
aaacgtgttc ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac 420  
ccaaaaggcc aactgggtgt gcctggccac cggtttctac cccgaccacg tggagctgag 480  
ctggtgggtg aatgggaagg aggtgcacag tggggtctgc acagaccgc agcccctcaa 540  
ggagcagccc gccctcaatg actccagata cgctctgagc agccgcctga gggctctcggc 600  
caccttctgg caggaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc 660  
ggagaatgac gagtggacctc aggatagggc caaacccgctc acccagatcg tcagcgcccga 720  
ggcctggggg agagcagact aa 742

15

ES 2 699 320 T3

<210> 9  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Una porción truncada de la cadena alfa del tcr para gag parental que incluye un resto Cys introducido

<400> 9

10

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Thr Asn  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 699 320 T3

<210> 10  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Una porción truncada de la cadena beta del tcr para gag parental que incluye un resto Cys introducido

<400> 10

10

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe  
 35 40 45

Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg  
 50 55 60

Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Asp  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 699 320 T3

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

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

Arg Ala Asp

5 <210> 11  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de región variable de la cadena alfa del TCR para GAG mutada de alta afinidad  
 <400> 11

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Ser Ala  
 85 90 95

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

Pro His

15 <210> 12  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de región variable de la cadena alfa del TCR para GAG mutada de alta afinidad  
 <400> 12

ES 2 699 320 T3

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Ser Ala  
85 90 95

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

Pro His

<210> 13

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de región variable de la cadena alfa del TCR para GAG mutada de alta afinidad

<400> 13

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
20 25 30

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

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

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



ES 2 699 320 T3

<400> 15

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe  
35 40 45

Gln Tyr Ala Leu Gly Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg  
50 55 60

Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn  
65 70 75 80

Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Asp  
85 90 95

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

Thr

5 <210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <400> 16

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu  
1 5

15 <210> 17  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Enlazador de TCRmc corto

<400> 17

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

25

ES 2 699 320 T3

<210> 18  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Enlazador de TCRmc largo  
 <400> 18  
 10  
 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> 19  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Porción truncada de la secuencia de aminoácidos codificada por TRAC  
 20  
 <400> 19  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 20 25 30  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys  
 35 40 45  
 25  
 <210> 20  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Porción truncada de la secuencia de aminoácidos codificada por TRBC1  
 <400> 20

ES 2 699 320 T3

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> 21
- <211> 56
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Porción truncada de la secuencia de aminoácidos codificada por TRBC2
- <400> 21

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> 22
- <211> 3342
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> vector pEX954
- <400> 22

ES 2 699 320 T3

gatctcgatc	ccgcgaaatt	aatacgactc	actatagggg	gaccacaacg	gtttccctct	60
agaaataatt	ttgtttaact	ttaagaagga	gatataatcg	atgtctaact	cgagtgacaa	120
gtctgtctgc	ctattcacccg	atthttgattc	tcaaacaaat	gtgtcacaaa	gtaaggattc	180
tgatgtgtat	atcacagaca	aatgtgtgct	agacatgagg	tctatggact	tcaagagcaa	240
cagtgtctgtg	gcctggagca	acaaatctga	ctttgcatgt	gcaaacgcct	tcaacaacag	300
cattattcca	gaagacacct	tcttccccag	cccagaaagt	tcctaagctt	gaattccgat	360
ccggctgcta	acaagcccg	aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	tgagcaataa	420
ctagcataac	cccttggggc	ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	gaaaggagga	480
actatatccg	gataattctt	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	540
taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtgaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	600

ES 2 699 320 T3

cggaaccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 660  
 ataaccctga taaatgcttc aataatattt tgttaaaatt cgcgttaaatt ttttgttaaa 720  
 tcagctcatt ttttaaccaa taggcgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat 780  
 agaccgagat agggttgagt gttggtccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg 840  
 tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggcca ctacgtgaac 900  
 catcaccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta 960  
 aaggagccc cggatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag 1020  
 ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg 1080  
 taaccaccac acccgccgcg cttaatgcmc cgctacaggg cgcgtcaggt ggcacttttc 1140  
 ggggaaatgt gcgcggaacc cctatgtgtt tatttttcta aatacattca aatagtatc 1200  
 cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga 1260  
 gtattcaaca tttcogtgtc gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt 1320  
 ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 1380  
 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 1440  
 aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg 1500  
 ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 1560  
 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 1620  
 gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 1680  
 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 1740  
 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 1800  
 cagcaatggc aacaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact cttagcttccc 1860  
 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 1920  
 cccttcggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg 1980  
 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 2040  
 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 2100  
 tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatacttttag attgatttaa 2160  
 aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 2220  
 aatccctta acgtgagttt tcggtccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 2280  
 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaccac 2340  
 cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt cccaaggtaa 2400  
 ctggcttcag cagagcgcag ataccaata ctgtccttct agtgtagccg tagttagccc 2460

ES 2 699 320 T3

accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag 2520  
 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 2580  
 cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc 2640  
 gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 2700  
 ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca 2760  
 cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 2820  
 tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 2880  
 ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 2940  
 ttctgcggtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 3000  
 ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 3060  
 gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc aatggtgcac 3120  
 tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta 3180  
 cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg 3240  
 gcttgtctgc tcccggcacc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg 3300  
 tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc ag 3342

<210> 23  
 <211> 3836  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> vector pEX821

10

<400> 23

ES 2 699 320 T3

gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc actatagggg gaccacaacg gtttccctct	60
agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga gatatacata tgaacgctgg tgctactcag	120
accccaaat tccaggtcct gaagacagga cagagcatga cactgcagtg tgcccaggat	180
atgaaccatg aatacatgtc ctggtatcga caagaccag gcatggggct gaggctgatt	240
cattactcag ttggtgctgg tctactgac caaggagaag tccccaatgg ctacaatgtc	300
tccagatcaa ccacagagga tttcccgtc aggctgctgt cggctgctcc ctcccagaca	360
tctgtgtact tctgtgccag caggccggga ctagcgggag ggcgaccaga gcagtacttc	420
gggccgggca ccaggctcac ggtcacagag gacctgaaa acgtgttccc acccgaggtc	480
gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc tcccacacc aaaaggccac actggtgtgc	540
ctggccaccg gtttctacc cgaccacgtg gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag	600
gtgcacagtg ggtctgcac agaccgcag cccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac	660
tccagatag ctctgagcag ccgcctgagg gtctcggcca cttctggca ggacccccgc	720

ES 2 699 320 T3

aaccacttcc	gctgtcaagt	ccagttctac	gggctctcgg	agaatgacga	gtggaccag	780
gatagggcca	aacccgtcac	ccagatcgtc	agcgcgaggg	cctggggtag	agcagactaa	840
gcttgaattc	cgatccggct	gctaacaaag	cccgaagga	agctgagttg	gctgctgcca	900
ccgctgagca	ataactagca	taacccttg	gggcctctaa	acgggtcttg	aggggttttt	960
tgctgaaag	aggaactata	tccggataat	tcttgaagac	gaaagggcct	cgtgatacgc	1020
ctatTTTTat	aggttaaatgt	catgataata	atggtttctt	agacgtcagg	tggcactttt	1080
cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatTTTTct	aaatacattc	aaatatgtat	1140
ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	atTTTgttaa	aattcgcgtt	1200
aaatTTTTgt	taaactagct	cattTTTTaa	ccaataggcc	gaaatcggca	aaatccotta	1260
taaataaaaa	gaatagaccg	agatagggtt	gagtgttggt	ccagtttggg	acaagagtcc	1320
actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	agggcgaaaa	accgtctatc	agggcgatgg	1380
cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	TTTTTTgggg	tcgaggtgcc	gtaaagcact	1440
aaatcggaac	cctaaagggg	gcccccgatt	tagagcttga	cggggaaagc	cggcgaacgt	1500
ggcgagaaa	gaaggggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	agggcgctgg	caagtgtagc	1560
ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacaccgc	cgcgcttaat	gcgccgctac	agggcgcgctc	1620
aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatTTT	tctaaataca	1680
ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	1740
aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgtcgcctt	attccctTTT	ttgcggcatt	1800
ttgccttct	gtTTTTgctc	accagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	1860
gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	1920
TTTTcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactTTT	aaagttctgc	tatgtggcgc	1980
ggtattatcc	cgtgttgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	actatttctca	2040
gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	2100
aagagaatta	tgcagtgctg	ccataacat	gagtgataac	actgcggcca	acttacttct	2160
gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgctTTTTtg	cacaacatgg	gggatcatgt	2220
aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaaacg	acgagcgtga	2280
caccacgatg	cctgcagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	2340
tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	ttgcaggacc	2400
acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	gagccgggtga	2460
gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	cccgtatcgt	2520
agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgcgtga	2580

ES 2 699 320 T3

gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 2640  
 ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 2700  
 taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt 2760  
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 2820  
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 2880  
 ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta 2940  
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 3000  
 aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc 3060  
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca 3120  
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 3180  
 aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg 3240  
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtctgt 3300  
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 3360  
 cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 3420  
 tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 3480  
 tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgagcga 3540  
 ggaagcggaa gagcgcctga tgcggtatct tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca 3600  
 ccgcaatggt gcaactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca 3660  
 ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgccca acacccgctg 3720  
 acgcgccttg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct 3780  
 ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcag 3836

<210> 24  
 <211> 378  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena beta del TCR para GAG parental soluble truncada que contiene un resto Cys introducido unido a IL-2 TS a través de un enlazador peptídico

10

<400> 24

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe

15

ES 2 699 320 T3

	35		40		45														
Gln	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Pro	Asp	Arg				
	50					55					60								
Phe	Ser	Gly	His	Gln	Phe	Pro	Asn	Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Asn	Val	Asn				
	65				70					75					80				
Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Asp				
				85					90					95					
Thr	Val	Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val				
			100					105						110					
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu				
		115					120					125							
Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys				
	130					135					140								
Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val				
	145				150					155					160				
Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu				
				165					170					175					
Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg				
			180					185						190					
Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg				
		195					200						205						
Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln				
	210					215					220								
Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly				
	225				230					235					240				
Arg	Ala	Asp	Pro	Gly	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln				
				245					250						255				
Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly				
			260					265					270						
Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys				
		275					280					285							

ES 2 699 320 T3

Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu  
 290 295 300

Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser  
 305 310 315 320

Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val  
 325 330 335

Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr  
 340 345 350

Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr  
 355 360 365

Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 370 375

<210> 25

<211> 822

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica la cadena alfa del TCR para GAG parental de longitud completa con codones optimizados para la expresión en ser humano

<400> 25

atgatgaaga gcctgagggg gctgctggtg atcctgtggc tgcagctgtc ctgggtgtgg 60  
 agccagcaga aggaggtgga gcagaatagc ggccctctga gcgtgcccga gggcgccatc 120  
 gccagcctga actgtaccta cagcgacaga ggcagccaga gcttcttctg gtacaggcag 180  
 tacagcggca agagccccga gctgattatg ttcattctaca gcaacggcga caaggaggac 240  
 ggcagattca ccgcccagct gaacaaggcc agccagtaca tcagcctgct gatccgggat 300  
 agcaagctgt ccgacagcgc cacctacctg tgtgccgtga gaaccaatag cggctacgcc 360  
 ctgaatttcg gcaagggcac cagcctgctg gtgaccccc acatccagaa tcctgacccc 420  
 gccgtgtacc agctgagaga cagcaagagc agcgacaaga gcgtgtgtct gttcaccgac 480  
 ttcgacagcc agaccaacgt gtcccagagc aaggacagcg acgtgtacat caccgacaag 540  
 accgtgctgg acatgaggag catggacttc aagagcaaca gcgccgtggc ctggagcaac 600  
 aagagcgact tcgcctgtgc caacgccttc aacaacagca tcatccccga ggacaccttt 660  
 ttccccagcc ctgagagcag ctgtgacgtg aaactggtgg agaagagctt cgagaccgac 720  
 accaacctga acttccagaa cctgagcgtg atcggcttca gaatcctgct gctgaaggtg 780  
 gccggattca acctgctgat gaccctgaga ctgtggagca gc 822

5

10

15

ES 2 699 320 T3

<210> 26  
 <211> 930  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> ADN que codifica la cadena beta del TCR para GAG parental de longitud completa con codones optimizados para la expresión en ser humano

10

<400> 26

atgggacccg gcctgctgtg ctgggccctg ctgtgcctgc tgggagcccg actggtggac	60
gccggagtga cccagagccc caccacctg attaagacca ggggccagca ggtgaccctg	120
agatgtagcc ctaagagcgg ccacgatacc gtgtcctggt atcagcaggc cctgggccag	180
ggaccccagt tcatcttcca gtactacgag gaggaggaga ggcagagagg caacttcccc	240
gacagattca gcggccacca gttcccgaat tacagcagcg agctgaacgt gaatgccctg	300
ctgctgggcg acagcgcctt gtacctgtgt gccagcagcg acacagtgag ctacgagcag	360
tacttcggcc ctggcaccag actgaccgtg accgaggacc tgaagaacgt gttccctcct	420
gaggtggccg tgttcgagcc cagcgaggcc gagatcagcc acaccagaa ggccaccctg	480
gtgtgtctgg ccaccggctt ctaccccgac cacgtggagc tgtcctggtg ggtgaacggc	540
aaggaggtgc acagcggcgt gtccaccgac cccagcccc tgaaggagca gcccgccctg	600
aacgatagca ggtactgcct gagcagcagg ctgagagtga gcgccacctt ctggcagaac	660
ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg	720
accaggata gagccaagcc cgtgaccag atcgtgtccg ccgaggcctg gggcagagcc	780
gactgtggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgtccgccac catcctgtac	840
gagatcctgc tgggcaaggc cacactgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg	900
gctatggtga agcgggaagga cagcaggggc	930

15

<210> 27  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Cadena alfa del TCR para GAG parental de longitud completa

<400> 27

ES 2 699 320 T3

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

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

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

ES 2 699 320 T3

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

Ser Pro Glu Leu Ile Met 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 Ile Ser Leu  
85 90 95

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

Val Arg Thr Asn Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser  
115 120 125

Leu Leu Val Thr Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
260 265 270

Ser Ser

<210> 28  
<211> 310  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 699 320 T3

<220>

<223> Cadena beta del TCR para GAG parental de longitud completa

<400> 28

5

```

Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1           5           10           15

Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys
20           25           30

Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His
35           40           45

Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe
50           55           60

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
65           70           75           80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
85           90           95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100          105          110

Ser Asp Thr Val Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
115          120          125

Thr Val Thr 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

```

ES 2 699 320 T3

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> 29

<211> 207

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena alfa de un TCR para GAG clc6 soluble de alta afinidad que contiene un resto Cys introducido

<400> 29

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

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Gly Ala  
 85 90 95

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

5

10

ES 2 699 320 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena beta de un TCR para GAG clc6 soluble de alta afinidad que contiene un resto Cys introducido

<400> 30

Met Glu Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe  
 35 40 45

Gln Tyr Ala Leu Gly Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg  
 50 55 60

Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Asp  
 85 90 95

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

5

10

ES 2 699 320 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Asp

5 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre aftosa  
 <400> 31

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn  
 1 5 10 15

10 Pro Gly

15 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 32

20 Ser Leu Phe Asn Thr Val Ala Thr Leu  
 1 5

ES 2 699 320 T3

5  
<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 33

Ser Leu Phe Asn Thr Val Ala Val Leu  
1 5

10  
<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
15  
<400> 34

Ser Leu Ser Asn Thr Val Ala Thr Leu  
1 5

20  
<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
25  
<400> 35

Ser Ser Phe Asn Thr Val Ala Thr Leu  
1 5

30  
<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 36

Ser Leu Leu Asn Thr Val Ala Thr Leu  
1 5

40  
<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 37

Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Ala Thr Leu  
1 5

50  
<210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 38

Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Ala Val Leu  
1 5

55

ES 2 699 320 T3

5 <210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 39

Ser Leu Phe Asn Thr Ile Ala Thr Leu  
1 5

10 <210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
15 <400> 40

Ser Leu Phe Asn Thr Ile Ala Val Leu  
1 5

20 <210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
25 <400> 41

Ser Leu Phe Asn Phe Val Ala Thr Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a SLYNTVATL-HLA-A\*0201 y que comprende un dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR y un dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR CARACTERIZADO POR QUE
- 5 el dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR tiene la secuencia de la Figura 1a y el dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR tiene la secuencia de la Figura 1b, excepto que uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena alfa 95T, 96N, 97S, 98G y 100A, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1a, está/están mutado(s) y/o uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena beta 51Y, 52E, 53E y 54E, utilizando la
- 10 numeración mostrada en la Figura 1b, está/están mutado(s).
2. Un TCR como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena alfa 95S, 95G, 96A, 97H, 98D o 100S, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1a.
- 15 3. Un TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o más de los aminoácidos de la región variable de la cadena beta 51V, 51A, 52R, 52L, 53G o 54V, utilizando la numeración mostrada en la Figura 1b.
4. Un TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena alfa mostradas en la Figura 6a, 6b o 6c.
- 20 5. Un TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena beta mostradas en la Figura 7a o 7b.
- 25 6. Un TCR como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende los emparejamientos de las regiones variables de las cadenas alfa y beta mostrados en la siguiente tabla:

Secuencia de la región variable de la cadena alfa, Figura n.º	Secuencia de la región variable de la cadena beta, Figura n.º
1a	7a
1a	7b
6a	1b
6b	1b
6c	1b
6b	7b
6c	7b
6b	7a
6c	7a

7. Un TCR como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena alfa mostrada en la Figura 8a, y/o una de las secuencias del dominio constante de aminoácidos de la cadena beta mostradas en las Figuras 8b y 8c, que comprende opcionalmente una o más sustituciones fenotípicamente silenciosas.
- 30 8. Un TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un TCR dimérico que comprende
- 35 un primer polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR, y
- un segundo polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  de TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio
- 40 constante de la cadena  $\beta$  de TCR,
- estando los primero y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro entre restos de cisteína que sustituyen a Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01.
9. Un TCR como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, que está unido covalentemente a un agente terapéutico o fracción detectable.
- 45

10. Un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

5 11. Una célula que alberga un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un TCR como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10 12. Una composición farmacéutica que comprende un TCR como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un complejo de TCR multivalente como se reivindica en la reivindicación 10, o una pluralidad de células como se reivindica en la reivindicación 11, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**Figura 1a**

10 20  
\* \*  
M A Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D

30 40 50  
\* \* \*  
R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M F I Y S N G D K

60 70 80  
\* \* \*  
E D G R F T A Q L N K A S Q Y I S L L I R D S K L S D S A

90 100 110  
\* \* \*  
T Y L C A V R T N S G Y A L N F G K G T S L L V T P H

(SEQ ID No: 1)

**Figura 1b**

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

30 40 50  
\* \* \*  
H D T V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y Y E E E E R Q R

60 70 80  
\* \* \*  
G N F P D R F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S

90 100 110  
\* \* \*  
A L Y L C A S S D T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T

(SEQ ID NO: 2)

**Figura 2a**

atggcccagaaggagggtggagcagaattctggacccctcagtggtccagagggagccattgcctctcaattgcacttaca  
gtgaccgaggtcccagtccttcttggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgttcatatactccaatgg  
tgacaaagaagatggaaggfttacagcacagctcaataaagccagccagtatattccctgctcatcagagactccaagctc  
agtgattcagccacctacctctgtgcggtgcgcacaaattccgggtatgcactcaactcggcaaaggcacctcgtgttgg  
cacacccatatacagaacctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtacaagtctgtctgcctattca  
ccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtc  
tatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatcgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta  
ttcagaagacaccttcttcccagcccagaaagtctctaa  
(SEQ ID No: 3)

**Figura 2b**

atggaggctggagtcacacaaagtcccacacacctgatcaaacgagaggacagcaagtgactctgagatgctctcttaa  
gtctgggcatgactgtgtctgtaccaacagccctgggtcaggggcccagttatcttccagtattatgaggaggaag  
agagacagagaggcaactccctgatcgattctcaggtcaccagttccctaactatagctctgagctgaatgtgaacgcctg  
ttgctgggggactcggccctctatctctgtgccagcagcagaccgtctctacgagcagctactcgggcccggcaccagg  
ctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccac  
acccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaa  
ggaggtgcacagtggggctcagcacagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctg  
agcagccgctgaggtctcggccacctctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgggctc  
tcggagaatgacgagtgaccaggataggccaaaccgtcaccagatcgtcagcggcaggcctggggtagagca  
gactaa

(SEQ ID No: 4)

**Figura 3a**

MAQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQSF  
FWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKA  
SQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVRTNSGYALNFGK  
GTSLLVTPHIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTD  
FDSQTNVSSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SA  
VAWSNKSDFACANAFNNNSIIPEDTFFPSPSS

(SEQ ID No: 5)

**Figura 3b**

MEAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSW  
YQQALGGPQFIFQYEEERQRGNFPDRFSGHQF  
PNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSDTVSYEQYFG  
PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA  
TLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP  
LKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFR C Q  
VQFYGLSENDEWTQDRAKPV T Q I V S A E A W G R A D

(SEQ ID No: 6)

**Figura 4a**

ccatcgatggccccagaaggaggtggagcagaattctggacccctcagtgftccagagggagccattgcctctctcaattgc  
acttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgttcataactc  
caatggtgacaaaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtataattccctgctcatcagagactcc  
aagctcagtgattcagccactacctctgtgcggtgcgcacaaattccgggtatgactcaactcggcaaaggcacctgc  
tgttggtcacacccatataccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaatcgagtgacaagctgtctgc  
ctattcacgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaatgtgtctagacat  
gaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaac  
agcattattccagaagacaccttcttccccagccagaaagttcctaa  
(SEQ ID No: 7)

**Figura 4b**

tctctcattaatggaggctggagtcacacaaagtcccacacacctgatcaaacgagaggacagcaagtgactctgagatg  
ctctcctaagtctggcatgacactgtgtctggtaccaacagccctgggtcaggggccccagttatctttcagtattatga  
ggaggaagagagacagagaggcaacttccctgatcattctcaggtcaccagttccctaactatagctctgagctgaatgtg  
aacgcttgtgtctggggactcggccctctatctctgtgccagcagcgacaccgtctctacgagcagtaactcgggcccgg  
gcaccagg  
ctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctccac  
acccaaaaggccacactggtgtcctggccaccggttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaa  
ggaggtgcacagtgggtctgcacagaccgcagcccccaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctg  
agcagccgctgagggctcggccaccttctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctc  
tcggagaatgacgagtgaccaggatagggccaaaccgtaaccagatcgtcagcgcaggcctggggtagagca  
gactaa  
(SEQ ID No: 8)

**Figura 5a**

MAQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQS F  
FWYRQYS GKSP E L I M F I Y S N G D K E D G R F T A Q L N K A  
SQYISLLIRDSKLS D S A T Y L C A V R T N S G Y A L N F G K  
G T S L L V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D  
F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A  
VAWSNKSD 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)

**Figura 5b**

MEAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSW  
YQQALGQGPFIFQYEEEEERQ RGNFPDRFSGHQF  
PNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSDTVSYEQYFG  
PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA  
TLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV C TDPQP  
LKEQPALNDSRYALS SRLRVSA TFWQDPRNHFR C Q  
VQFYGLSENDEW 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)

**Figura 6a**

M A 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 I S L L I R D S K L S D S A T Y L C A V R S A  
H G Y S L N F G K G T S L L V T P H

(SEQ ID NO: 11)

**Figura 6b**

M A 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 I S L L I R D S K L S D S A T Y L C A V R S A  
H G Y A L N F G K G T S L L V T P H

(SEQ ID NO: 12)

**Figura 6c**

M A 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 I S L L I R D S K L S D S A T Y L C A V R G A  
H D Y A L N F G K G T S L L V T P H

(SEQ ID NO: 13)

**Figura 7a**

M E A G V T Q S P T H L I K T R G Q Q V T L R C S P K S G H D T  
V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y V R G V E R Q R G N F P D R  
F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S A L Y L C A S S D  
T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T

(SEQ ID NO: 14)

**Figura 7b**

M E A G V T Q S P T H L I K T R G Q Q V T L R C S P K S G H D T  
V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y A L G E E R Q R G N F P D R  
F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S A L Y L C A S S D  
T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T

(SEQ ID NO: 15)

**Figura 8a**

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: 19)

**Figura 8b**

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: 20)

**Figura 8c**

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: 21)

**Figura 9****PEX954**

gatctc gatcccgcgaaattaatac gactc actatagg gaggaccacaacgg tttccctctagaaataat tttgttaactttaaga  
aggagatataatcgatgtctaactcgagt gacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaggt  
aaggattctgatgtgtatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggctctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctg  
gagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaa  
gttcctaagcttgaattccgatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataa  
ctagcataaaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttgctgaaaggaggaactatatccggataattcttgaag  
acgaaagggcctcgtgatacgcctat tttataggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtgaggtggcacttttcggg  
gaaatgtgcgcggaaccctat tttgtttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgc  
ttcaataatattttgttaaaattcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttat  
aatcaaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttggacaagagtgccactattaagaacgtggactccaa  
cgtcaaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaatcaagtttttggggctcgagg  
tgccgtaaagcactaaatcggaaaccctaaagggagccccgatttagagcttgacgggggaaagccggcgaacgtggcga  
gaaaggaaaggaagaaagcgaagggagcggggcgttagggcgtggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccacc  
acaccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgctcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctat tttgtt  
tattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagta  
tgagtattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaa  
gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagttt  
tcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgccgggca  
agagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatg  
gcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtgataaactcggccaacttacttctgacaacgatcgg  
aggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaat  
gaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcga  
actacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagttgcaggaccacttctgcgctcggccc  
ttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat  
ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag

**Figura 9 Cont.**

ataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattttaattt  
aaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaataccttaacgtgagtttcgtccactgagcgtcagacc  
ccgtagaaaagatcaaaggatctcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaaacaaaaaaccaccgctacc  
agcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaata  
ctgtccttctagtgtagccgtagtaggcccaccactcaagaactctgtagcaccgctacalacctcgtctgctaactctgtt  
accagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagtaccggataaggcgcagcg  
gtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt  
gagctatgagaaagcggcacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaacagg  
agagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagctctgcgggttcgccacctctgactgagcgt  
cgatcttgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctcctggcctttg  
ctggcctttgctcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagtgagctgataccgt  
cgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgcctgatgcggtattttctcfta  
cgcatctgtcgggtattcacaccgcaatggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacact  
ccgtatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtct  
gtcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggttcaccgtcatcaccgaaa  
cgcgcgaggcag

(SEQ ID NO: 22)

Figura 10

**PEX821**

gatctcgatcccgcgaaattaatacgaactactatagggagaccacaacggttccctctagaataatfttgttaactttaaga  
aggagatatacatatgaacgctggtgtcactcagaccccaaaattccaggctcctgaagacaggacagagcatgacactgca  
gtgtgccaggatgaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactca  
gttggtgctggtatcactgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgtca  
ggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcaggccgggactagcgggaggcgcaccagag  
cagtactcgggcccggcaccaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgtccaccaggctcgtgtgtttga  
gccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtcctggccaccggtttctaccccgaccacgtgg  
agctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtctgcacagaccgcagcccccaaggagcagccccg  
ccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgcctgagggtctcggccacctctggcaggacccccgcaaccactcc  
gctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtgaccaggataggccaaaaccgacaccagatcgtc  
agcggcaggcctggggtagagcagactaagcttgaattccgatccggctgctaacaagcccgaagggaagctgagttg  
gctgtgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtcttgagggggttttctgaaaggag  
gaactataccggataattctgaagacgaaaggccctcgtgatacgcctatftttataggtaatgcatgataataatggttct  
tagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctc  
atgagacaataaccctgataaatgctcaataatatttgttaaaattcgcgttaattttgttaaatcagctcatttttaaccaata  
ggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtggtgtccagtttgaacaagagt  
ccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgatggcccactacgtgaaccatca  
cccaatcaagtttttggggctcgagggtgccgtaaagcactaaatcggaaaccctaaaggagcccccgatttagagcttgac  
ggggaaaagccggcgaacgtggcgagaaagggaaggaaagcgaaggagcggggcgtaggggcgtggcaagtgc  
tagcggctcacgctgcgcgtaaccaccacaccgccgcgctaatgcggcgtacagggcgcgctcaggtggcacttttcgg  
ggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatg  
ctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgctgcccttattcccttttgcggcattttgccttctgt  
tttctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtgtacatcgaactggat  
ctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcg  
cggattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggctgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactca  
ccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctgatgtataactg  
cggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcg  
ccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatgctgcagcaatggcaa  
caacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaa  
gttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgtgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcg  
cggatcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgtatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactatg  
gatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatata  
cttagattgattaaaactcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgt  
gagtttccgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactgtctg  
cttgcacaacaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactg  
gctcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagttagcgcgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccg  
cctacatactcgtctgtaaatcctgttaccagtggtcgtgccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaaga  
cgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttctgtcacacagcccagcttggagcgaacgacct  
acaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatcc

**Figura 10 Cont.**

ggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtc  
gggtttcggcacctctgactgagcgtcgatftttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacg  
cggccttttacggttcctggcctttgctggcctttgctcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtatta  
ccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaag  
agcgcctgatgcggtatfttctccttacgcatctgtgcggtatftcacaccgcaatggtgcactctcagtacaatctgctctgatg  
ccgcatagftaagccaagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgc  
tgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcag  
aggftttcaccgcatcaccgaaacgcgcgaggcag  
(SEQ ID NO: 23)

**Figura 11**

MEAGV TQSP THLIK TRGQQ VTLRC SPKSG HDTVSW  
YQQALGQGPQFI FQY YEEEEERQRGNFPDRFSGHQF  
PNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSDTVSYEQYFG  
PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA  
TLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV **C** TDPQP  
LKEQPALNDSRYALS SRLRVSATFWQDPRNHFR CQ  
VQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADPG  
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK  
LTRMLTFK F YMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVL  
NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC  
EYADETAT IVEFLNRWITFCQSIISTLT

(SEQ ID NO: 24)

Figura 12

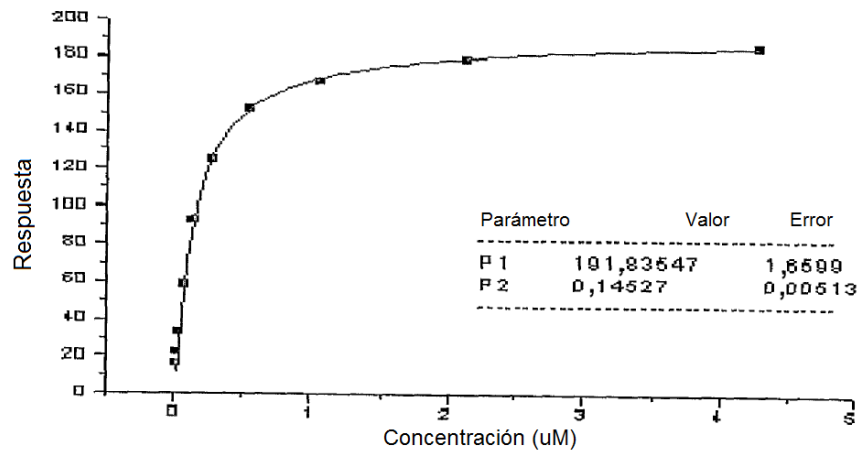
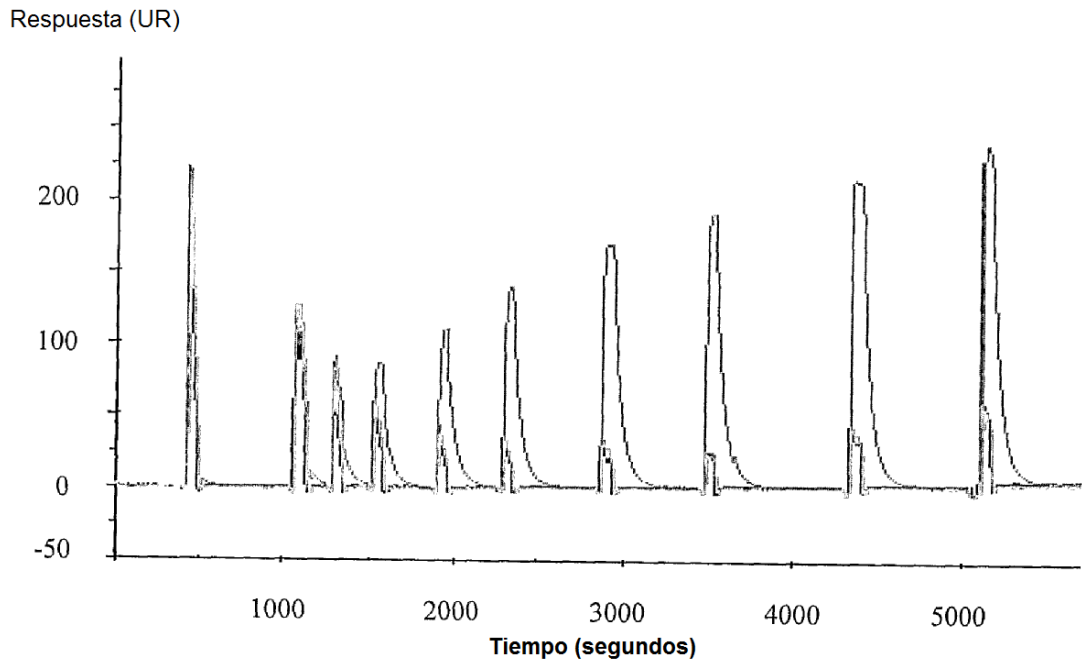


Figura 13

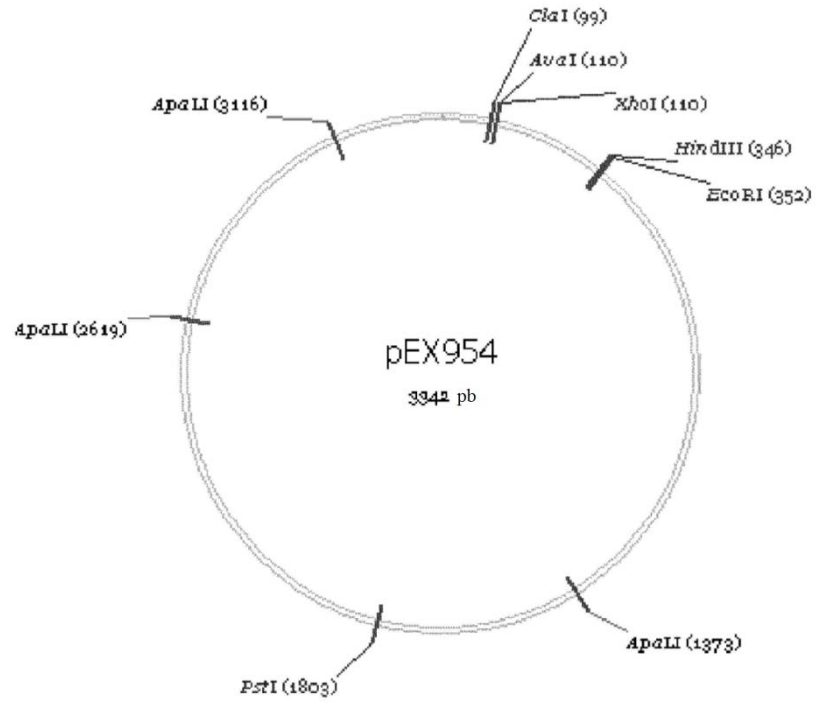
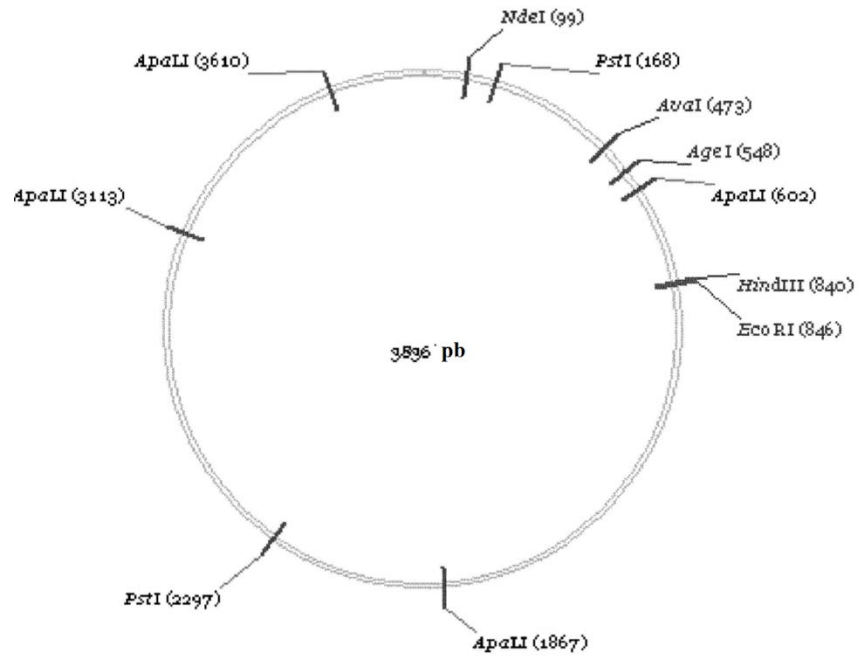


Figura 14



**Figura 15a**

atgatgaagagcctgaggggtgctgctgggtgatcctgtggctgcagctgtcctgggtgtggagccagcag  
aaggaggtggagcagaatagcgccctctgagcgtgcccagggcgccatcgccagcctgaactgtacc  
tacagcgacagaggcagccagagcttcttctggtacaggcagtacagcggcaagagccccgagctgatt  
atgttcatctacagcaacggcgacaaggaggacggcagattcaccgcccagctgaacaaggccagccag  
tacatcagcctgctgatccgggatagcaagctgtccgacagcggccacctacctgtgtgcccgtgagaacc  
aatagcggctacgcccgaatttcggcaagggcaccagcctgctgggtgacccccacatccagaatcct  
gaccccgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcgcacaagagcgtgtgtctgttcaccgacttc  
gacagccagaccaacgtgtcccagagcaaggacagcgcagctgtacatcaccgacaagaccgtgctggac  
atgaggagcatggacttcaagagcaacagcgcctggcctggagcaacaagagcgcacttcgctgtgccc  
aacgcttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagcctgagagcagctgtgacgtg  
aaactggtggagaagagcttcgagaccgacaccaacctgaacttcagaacctgagcgtgatccgcttc  
agaatcctgctgctgaagggtggccggattcaacctgctgatgacctgagactgtggagcagc  
(SEQ ID NO: 25)

**Figura 15b**

atgggacccggcctgctgtgctgggcccctgctgtgctgctgggagccggactggtggacgcccggagtg  
accagagccccaccacctgattaagaccaggggcccagcaggtgacctgagatgtagccctaagagc  
ggccacgataccgtgtcctggtatcagcagggccctgggcccagggacccccagttcatcttccagtaactac  
gaggaggaggagaggcagagaggcaacttccccgacagattcagcggccaccagttcccccaattacagc  
agcagctgaacgtgaatgccctgctgctgggacagcgcctgtacctgtgtgccagcagcgcacaca  
gtgagctacgagcagtaacttcggcccctggcaccagactgacctgacctgagggacctgaagaacgtgttc  
cctcctgaggtggccgtgttcgagcccagcagggccgagatcagccacaccagaaggccaccctggtg  
tgtctggccaccggcttctaccccgaccacgtggagctgtcctggtgggtgaacggcaaggaggtgcac  
agcggcgtgtccaccgacccccagccccgaaggagcagcccgcctgaacgatagcaggtactgcctg  
agcagcaggctgagagtgagcgcacaccttctggcagaacccccggaaccttcagatgccaggtgcag  
ttctacggcctgagcagagaacgacgagtgaccaggtatagagccaagcccgtgaccagatcgtgtcc  
gccgagccctggggcagagccgactgtggcttaccagcgcagagctaccagcagggcgtgctgtccgcc  
accatcctgtacgagatcctgctgggcaaggccacactgtacgcctgctggtgtccgcccctggtgctg  
atggctatggtgaagcgggaaggacagcaggggc  
(SEQ ID NO: 26)

**Figura 16a**

M M K S L R V L L V I L W L Q L S W V W S Q Q K E V E Q N S G P L S 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 I S L L I R D S K L S D  
S A T Y L C A V R T N S G Y A L N F G K G T S L L V T P H I Q N P D P  
A V Y Q L R D S K S S D K S V C L 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 C D V K L V E K S F E T D T N L N F  
Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W S S

(SEQ ID NO: 27)

**Figura 16b**

M G P G L L C W A L L C L L G A G L V D A G V T Q S P T H L I K T R G  
Q Q V T L R C S P K S G H D T V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y Y E  
E E E R Q R G N F P D R F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S  
A L Y L C A S S D T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V F P P  
E V A V F E P S E A E I S H 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 C L S S R  
L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A  
K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L S A T I L Y  
E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G

(SEQ ID NO: 28)

Figura 17

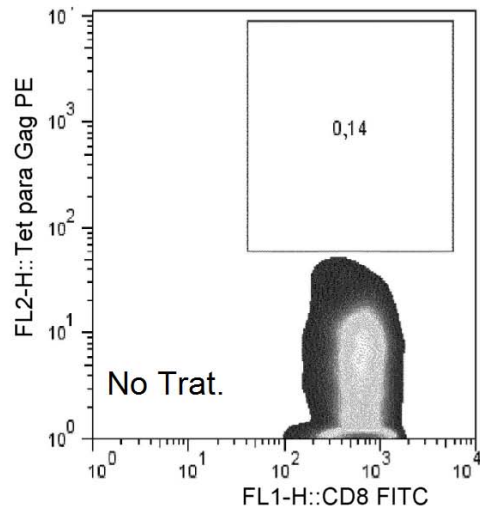


Figura 17a

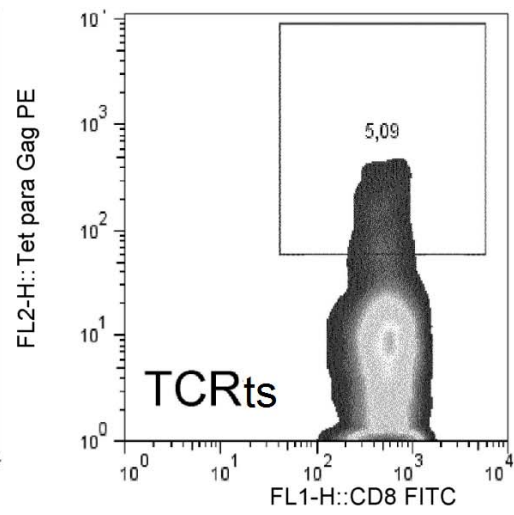


Figura 17b

**Figura 18a**

M A 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 I S L L I R D S K L S D S A T Y L C A V R G A  
H D Y A L N F G K G T S L L V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S  
K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K  
C V L D 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)

**Figura 18b**

M E A G V T Q S P T H L I K T R G Q Q V T L R C S P K S G H D T  
V S W Y Q Q A L G Q G P Q F I F Q Y A L G E E R Q R G N F P D R  
F S G H Q F P N Y S S E L N V N A L L L G D S A L Y L C A S S D  
T V S Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V F P P E V A V F E  
P S E A E I S H 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 C 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: 30)

Figura 19

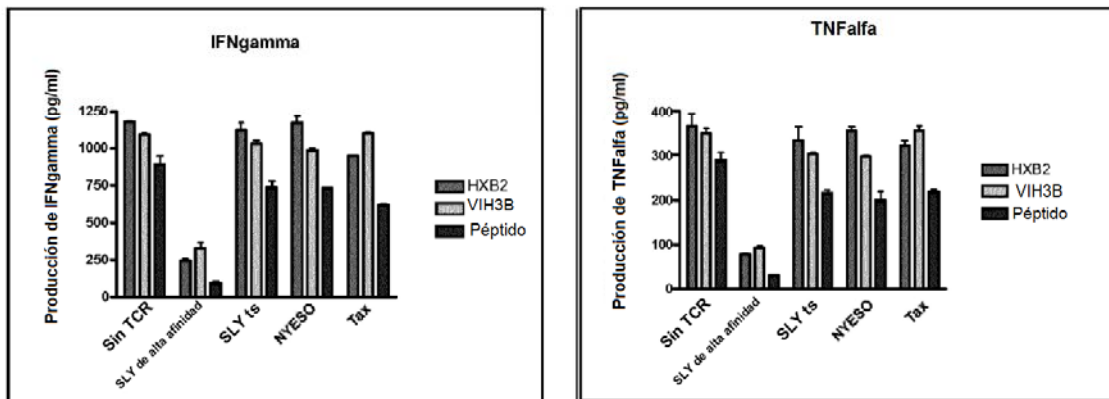


Figura 20

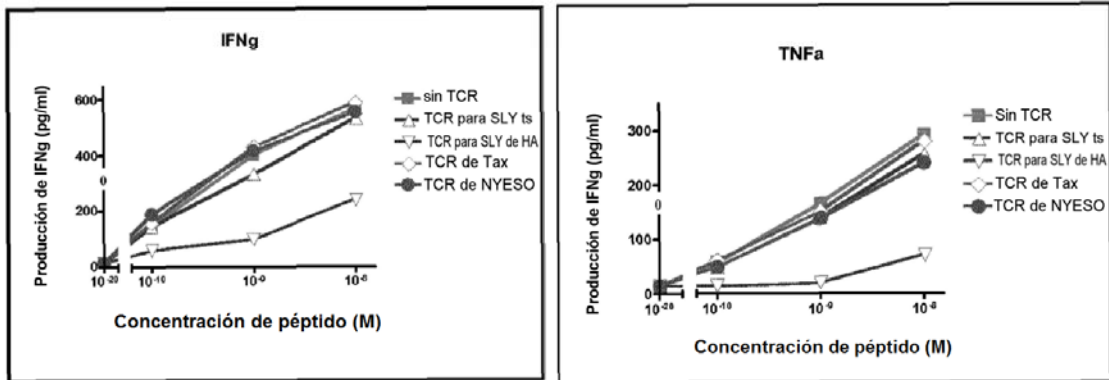


Figura 21

