(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 959 587**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2016 PCT/GB2016/051084**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170320**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2016 E 16718859 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023 EP 3286210**

(54) Título: **Receptor de células T**

(30) Prioridad:

20.04.2015 GB 201506642

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2024

(73) Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.0%)
University College London Gower Street
London WC1E 6BT, GB

(72) Inventor/es:

STAUSS, HANS;
THOMAS, SHARYN;
WILLCOX, BEN y
MOHAMMED, FIYAZ

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Receptor de células T

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un receptor de células T (TCR). En particular, la presente invención se relaciona con un TCR modificado que tiene un alto nivel de expresión en la superficie de la célula cuando se expresa como un TCR exógeno en comparación con la secuencia del TCR de la línea germinal correspondiente. La presente invención también se relaciona con métodos para aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula.

Antecedentes de la invención

La terapia génica con receptores de células T (TCR) es la transferencia de cadenas del TCR específicas de antígeno a células T receptoras, redirigiendo así la especificidad de los linfocitos T para dirigirse a antígenos de interés.

Los TCR introducidos difieren mucho en su capacidad para expresarse en la superficie de la célula.

Los TCR introducidos y fuertemente expresados se coexpresan con el TCR endógeno o incluso pueden superar al TCR endógeno en la expresión en la superficie de la célula. Los TCR introducidos y débilmente expresados están ausentes de la superficie de la célula cuando se coexpresan con un TCR endógeno fuerte (Figura 1).

Los altos niveles de expresión de un TCR específico de antígeno en la superficie de las células T dan como resultado una mayor avidez de las células T, lo que es beneficioso para la eficacia de la terapia terapéutica con TCR.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos y enfoques que aumenten la expresión en la superficie de la célula del TCR débilmente expresado.

Resumen de aspectos de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores han determinado una serie de posiciones y residuos de aminoácidos clave dentro de las regiones marco del TCR que mejoran la expresión en la superficie de la célula del TCR.

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un TCR modificado que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; P9 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.
en donde al menos un residuo de aminoácido no está presente en la correspondiente secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal y en donde dicho TCR tiene un nivel más alto de expresión en la superficie de la célula cuando se expresa en una célula con relación a un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de línea germinal.

Al menos un residuo de aminoácido puede seleccionarse de una lista de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; y
R43 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender L96 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender R9 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender Y10 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender T24 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender una pluralidad de residuos de aminoácidos como se define en el presente documento.

El TCR modificado puede comprender L96 de la cadena α; R9 de la cadena β y Y10 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y/o una cadena β del TCR de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena β unida por una secuencia de autoescisión interna o un sitio de entrada al ribosoma interno.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

El vector puede ser un vector de retrovirus, un vector de lentivirus o un transposón.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención o un vector de la invención.

La célula puede ser una célula T, una célula asesina natural o una célula madre.

La célula puede derivarse de una célula T, una célula asesina natural o una célula madre aislada de un sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una vector de la invención o una célula que expresa un TCR que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; P9 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

La célula puede expresar un TCR que comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos como se define en el presente documento.

La célula puede expresar un TCR modificado de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para producir una célula de la presente invención que comprende la etapa de transducir una célula *in vitro* o *ex vivo* con un vector de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;
(ii) determinar un residuo de aminoácido de la secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR en una o más posiciones seleccionadas de:

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; 20 de la cadena α; 50 de la cadena α; 5 de la cadena α; 8 de la cadena α; 86 de la cadena α; 39 de la cadena α; 55 de la cadena α; 43 de la cadena β; 66 de la cadena α; 19 de la cadena β; 21 de la cadena β; 103 de la cadena β; 3 de la cadena α; 7 de la cadena α; 9 de la cadena α; 11 de la cadena α; 16 de la cadena α; 18 de la cadena α; 21 de la cadena α; 22 de la cadena α; 26 de la cadena α; 40 de la cadena α; 47 de la cadena α; 48 de la cadena α; 49 de la cadena α; 51 de la cadena α; 52 de la cadena α; 53 de la cadena α; 67 de la cadena α; 68 de la cadena α; 74 de la cadena α; 76 de la cadena α; 79 de la cadena α; 81 de la cadena α; 83 de la cadena α; 90 de la cadena α; 92 de la cadena α; 93 de la cadena α; y 101 de la cadena α; y

(iii) alterar el residuo de aminoácido en una o más posiciones enumeradas en la etapa (ii) a un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α,

y en donde el método no es un método para el tratamiento de un cuerpo humano o de animal.

El método puede comprender la etapa de alterar una secuencia de aminoácidos del TCR de modo que comprenda una pluralidad de residuos de aminoácidos como se define en el presente documento.

La secuencia de aminoácidos del TCR puede alterarse mediante mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar un TCR, que cuando se expresa en una célula, tiene un alto nivel de expresión en la superficie de la célula, cuyo método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un grupo de secuencias de aminoácidos del TCR; y
(ii) seleccionar una secuencia de aminoácidos del TCR que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;

El método puede comprender la etapa de seleccionar una secuencia de aminoácidos del TCR que comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel de expresión en la superficie de la célula de un TCR que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR; y
(ii) (ii) determinar si la secuencia del TCR comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α;

L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;

en donde se determina que una secuencia que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos enumerados es un TCR de alta expresión y se determina que una secuencia que no comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos enumerados es un TCR de baja expresión.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un TCR modificado, una secuencia de ácido nucleico o un vector de la presente invención para aumentar la expresión del TCR en la superficie de la célula, y en donde el uso no está en un método para el tratamiento del cuerpo humano o de animal.

Se ha demostrado que la sustitución con residuos de aminoácidos clave en un TCR débilmente expresado da como resultado una expresión muy mejorada. También se ha demostrado que las sustituciones de aminoácidos únicos de residuos clave individuales para reemplazar residuos "débiles" con residuos de aminoácidos "fuertes" como se define en la presente invención, así como una variedad de combinaciones de sustituciones de aminoácidos, aumentaron la expresión del TCR.

El cambio de un aminoácido se puede lograr de forma económica, rápida y eficaz mediante mutagénesis, por ejemplo mutagénesis por PCR. Este método de aumentar la expresión en la superficie de la célula del TCR no interfiere con el reconocimiento del péptido/MHC por parte del TCR y no afecta el plegamiento o la estructura del TCR. Por lo tanto, la expresión del TCR aumenta con un impacto mínimo en la estructura del TCR.

Descripción de las figuras

Figura 1 - A) Representación de un TCR exógeno débil y un TCR exógeno fuerte en una célula que también expresa un TCR endógeno. B) Dibujo esquemático de las cadenas TCRα y TCRβ - SP: péptido señal; FR: región marco; CDR: región determinante de complementariedad; IG: dominio similar a inmunoglobulina de la región C; CP: péptido de conexión; TM: dominio transmembrana; IC: dominio intracelular.

Figura 2 - Células T primarias transducidas con un TCR de WT1 modificado que muestra dominancia del TCR.

Figura 3 - Clonotipado del TCR del TCR endógeno fuerte y débil.
En la tabla se muestra (i) el número total de segmentos variables alfa y beta fuertes y débiles que se secuenciaron y (ii) los segmentos variables alfa y los segmentos variables beta que muestran dominancia en la población del TCR endógena fuerte o débil, junto con el número total de cada uno de los segmentos variables dentro de cada población. Los segmentos alfa y beta se han clasificado utilizando la nomenclatura IMGT.

Figura 4 - Ilustración de construcciones utilizadas para evaluar las características de los TCR genéricos de expresión fuerte y débil.

Figura 5 - Expresión de los TCR fuertes y débiles en un entorno no competitivo (células Jurkat sin TCR).

Figura 6 - Expresión de los TCR fuertes y débiles en un entorno competitivo (células Jurkat que expresan el TCR híbrido WT1).

Figura 7 - Expresión de los TCR fuertes y débiles en células Jurkat que expresan baja, media y alta expresión del TCR de WT1 modificado.

Figura 8 - Análisis bioinformáticos de los TCR de expresión fuerte y débil.
A) La información de secuenciación del clonotipado se utilizó para comparar todos los residuos en cada posición para todos los TCR fuertes y débiles que se habían secuenciado. Después de la alineación del TCR, los residuos que tuvieron una alta aparición en posiciones particulares en el TCR fuerte, en comparación con el TCR débil, se indican (*) en la figura usando TRAV38 1 como ejemplo.
B) Análisis de la estructura 3D prevista de los segmentos variables del TCR fuertes y débiles.

Figura 9 - Mutación de todos los residuos clave identificados para revertir los TCR de expresión fuerte y débil tanto en un entorno no competitivo (células Jurkat que no expresan TCR) y un entorno competitivo (células Jurkat que expresan el TCR híbrido WT1).

Figura 10 - La alteración de residuos clave individuales afecta el nivel de expresión de un TCR exógeno en un entorno no competitivo (células Jurkat que no expresan TCR).

Figura 11 - La alteración de residuos clave individuales impacta el nivel de expresión de un TCR exógeno en un entorno competitivo (células Jurkat que expresan el TCR híbrido WT1).

Figura 12 - Un dispositivo informático de propósito general que se utiliza para proporcionar o soportar algunas realizaciones.

Figura 13 - Células Jurkat sin TCR (A) y las células Jurkat que expresan el TCR de WT1 modificado (B) se transdujeron con el retrovirus pMP71 que codifica los TCR indicados. 72 h después de la transducción, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5, etiqueta Myc y TCR beta constante murino. Las células se seleccionaron según la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión de etiqueta V5, etiqueta Myc y TCR beta constante murino. También se determinó la MFI de etiqueta V5, etiqueta Myc y la expresión del TCR beta constante murino para las células de alta expresión CD19+. (C) MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc para células Jurkat sin TCR. (D) MFI de etiqueta V5, etiqueta Myc y TCR beta constante murino para células Jurkat que expresan el TCR de WT1 modificado.

Figura 14 - El cambio de residuos de dominio variable a L96α, R9β y Y10β mejora la expresión del TCR de CMV y WT1 en células Jurkat.

Figura 15 - Cambio de residuos de dominio variable a L96α, R9β y Y10β mejora la producción de citoquinas específicas de antígeno.

Figura 16 - El cambio de residuos de dominio variable a L96α, R9β y Y10β mejora la producción de citoquinas específicas de antígeno.

Figura 17 - Las células transducidas con los TCR bien expresados y mal expresados contienen cantidades similares de ARNm del TCR.

Figura 18 - Contribución del TCR alfa frente a TCR beta a la expresión del TCR.

Descripción detallada

Receptor de células T

Durante el procesamiento de antígenos, los antígenos se degradan dentro de las células y luego se transportan a la superficie de la célula mediante las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células T pueden reconocer este complejo péptido:MHC en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Hay dos clases diferentes de moléculas del MHC, MHC I y MHC II, que liberan péptidos desde diferentes compartimentos celulares a la superficie de la célula.

El receptor de células T o TCR es la molécula que se encuentra en la superficie de las células T y que se encarga de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del MHC. El heterodímero del TCR consta de una cadena α y β en el 95% de las células T, mientras que el 5% de las células T tienen TCR que constan de cadenas γ y δ.

La interacción del TCR con el antígeno y el MHC da como resultado la activación de sus linfocitos T a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores y moléculas accesorias especializadas.

Cada cadena del TCR es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y posee un dominio variable (V) de inmunoglobulina (Ig) del terminal N, un dominio constante (C) de Ig, una región transmembrana/que abarca la membrana celular, y una cola citoplásmica corta en el extremo terminal C (Figura 1B).

El dominio variable tanto de la cadena α como de la cadena β del TCR tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) hipervariables. La CDR3 es la principal CDR encargada de reconocer el antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que la CDR1 de la cadena αlfa interactúa con la parte terminal N del péptido antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena beta interactúa con la parte terminal C del péptido. Se cree que CDR2 reconoce la molécula del MHC. Las regiones marco (FR) se ubican entre las CDR. Estas regiones proporcionan la estructura de la región variable del TCR.

El repertorio de regiones variables del TCR se genera mediante la unión combinatoria de genes variables (V), de unión (J) y de diversidad (D); y por diversificación de la región N (nucleótidos insertados por la enzima desoxinucleotidil-transferasa).

Las cadenas α y γ se forman a partir de eventos de recombinación entre los segmentos V y J.

Las cadenas β y δ se forman a partir de eventos de recombinación que involucran a los segmentos V, D y J.

El locus del TCRα humano, que también incluye el locus del TCR δ, se encuentra en el cromosoma 14 (14q11.2). El locus del TCRβ está situado en el cromosoma 7 (7q34). La región variable de la cadena TCRα se forma mediante recombinación entre uno de los 46 segmentos Vα (variables) diferentes y uno de los 58 segmentos Jα (de unión) (Koop

et al.; 1994; Genomics; 19: 478-493). La región variable de una cadena del TCRβ se forma a partir de la recombinación entre 54 segmentos Vβ, 14 Jβ y 2 Dβ (de diversidad) (Rowen et al.; 1996; Science; 272:1755-1762).

Se han identificado los segmentos de genes V y J (y D según corresponda) para cada locus de la cadena del TCR y se conoce y anota la secuencia de la línea germinal de cada gen (por ejemplo, véase Scaviner & Lefranc; 2000; Exp Clin Immunogenet; 17: 83-96) y Folch & Lefranc; 2000; Exp Clin Immunogenet; 17: 42-54).
FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3 de la cadena α están codificados por el gen Vα. FR4 está codificado por el gen Jα (Figura 1B).

FR1, CRD1, FR2, CDR2 y FR3 de la cadena β están codificados por el gen Vβ. CDR3 está codificada por el gen Dβ y FR4 está codificado por el gen Jβ (Figura 1B).

Como la secuencia de la línea germinal de cada gen variable se conoce en la técnica (véase Scaviner & Lefranc; como se citó anteriormente y Folch & Lefranc; como se citó anteriormente) se pueden secuenciar Vα y/o Vβ de un TCR particular y se puede identificar el segmento V de la línea germinal que se utiliza en el TCR (véase, por ejemplo, Hodges et al.; 2003; J Clin Pathol; 56: 1-11, Zhou et al.; 2006; Laboratory Investigation; 86; 314-321).

El dominio constante del dominio del TCR consta de secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, formando un enlace entre las dos cadenas. El TCR de la presente invención puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β de modo que el TCR comprenda dos enlaces disulfuro en los dominios constantes (véase más abajo).

La estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas como CD3 que posee tres cadenas distintas (γ, δ y ε) en los mamíferos y la cadena ζ. Estas moléculas accesorias tienen regiones transmembrana cargadas negativamente y son vitales para propagar la señal del TCR al interior de la célula. Las cadenas CD3 y ζ, junto con el TCR, forman lo que se conoce como el complejo receptor de células T.

La señal del complejo de células T se ve reforzada por la unión simultánea de las moléculas del MHC a un correceptor específico. En las células T colaboradoras, este correceptor es CD4 (específico del MHC de clase II); mientras que en las células T citotóxicas, este correceptor es el CD8 (específico del MHC de clase I). El correceptor no sólo garantiza la especificidad del TCR por un antígeno, sino que también permite una interacción prolongada entre la célula presentadora del antígeno y la célula T y recluta moléculas esenciales (por ejemplo, LCK) dentro de la célula implicada en la señalización del linfocito T activado.

Por lo tanto, el término "receptor de células T" se utiliza en el sentido convencional para referirse a una molécula capaz de reconocer un péptido cuando se presenta mediante una molécula del MHC. La molécula puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser una construcción del TCR de cadena única.

La presente invención también proporciona la cadena α o la cadena β de dicho receptor de células T.

El TCR de la presente invención puede ser un TCR híbrido que comprende secuencias derivadas de más de una especie. Por ejemplo, se ha descubierto sorprendentemente que los TCR murinos se expresan más eficientemente en células T humanas que los TCR humanos. Por lo tanto, el TCR puede comprender regiones variables humanas y regiones constantes murinas. Una desventaja de este enfoque es que las secuencias constantes murinas pueden desencadenar una respuesta inmune, lo que lleva al rechazo de las células T transferidas. Sin embargo, los regímenes de acondicionamiento utilizados para preparar a los pacientes para la terapia con células T adoptivas pueden dar como resultado una inmunosupresión suficiente para permitir el injerto de células T que expresan secuencias murinas.

El TCR modificado de la presente invención comprende al menos un residuo de aminoácido como se define en el presente documento que no está codificado por el gen Vα o Vβ de la línea germinal. En otras palabras, el TCR modificado de la presente invención comprende una cadena α y/o cadena β que comprende un residuo de aminoácido alterado en una o más de las posiciones descritas en el presente documento, en donde el aminoácido del residuo de aminoácido alterado es un residuo como se define en el presente documento, en comparación con la cadena α y/o cadena β correspondientes codificadas por el gen Vα o Vβ de la línea germinal inalterada.

Los residuos de aminoácidos identificados en el presente documento están numerados de acuerdo con el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT). Este sistema es bien conocido en la técnica (Lefrance et al.; 2003; Dev Comp Immunol; 27: 55-77) y se basa en la alta conservación de la estructura de la región variable. La numeración tiene en cuenta y combina la definición de FR y CDR, datos estructurales de estudios de difracción de rayos X y la caracterización de los bucles hipervariables.

Las delimitaciones de las regiones FR y CDR se definen dentro del sistema de numeración IMGT. La región FR1 comprende las posiciones 1-26 (25-26 aminoácidos, dependiendo del grupo o subgrupo V-GENE) con el primer CYS en la posición 23. La región FR2 comprende las posiciones 39-55 (16-17 aminoácidos) con una TRP conservada en la posición 41. La región FR3 comprende las posiciones 66-104 (36-39 aminoácidos, dependiendo del grupo o subgrupo VGENE) con un aminoácido hidrófobo conservado en la posición 89 y el segundo CYS en la posición 104.

El residuo 1 del sistema de numeración IMGT es el primer residuo en FR1. El residuo 104 del sistema de numeración IMGT es el último residuo en FR3.

Como tal, el sistema de numeración utilizado en el presente documento se refiere a la posición del aminoácido dentro de toda la cadena α o de toda la cadena β, según corresponda.

Por lo tanto, la numeración IMGT permite realizar una descripción estandarizada de las posiciones de los aminoácidos dentro de las regiones variables del TCR y comparaciones con las secuencias codificadas de la línea germinal.

Los métodos adecuados para generar un TCR modificado de la presente invención son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, se puede realizar mutagénesis para alterar nucleótidos específicos en una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR. Dicha mutagénesis alterará la secuencia de aminoácidos del TCR de modo que comprenda al menos uno de los residuos de aminoácidos de acuerdo con la presente invención.

Un ejemplo de método de mutagénesis es el método Quikchange (Papworth et al.; 1996; Strategies; 9(3); 3-4). Este método implica el uso de un par de cebadores mutagénicos complementarios para amplificar una secuencia de ácido nucleico molde en una reacción de termociclado utilizando una ADN polimerasa sin desplazamiento de cadena de alta fidelidad, como la polimerasa *pfu*.

Los presentes inventores han determinado que la presencia de residuos de aminoácidos particulares en posiciones específicas de las regiones marco del TCR altera la expresión del TCR en la superficie de la célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión en la superficie de la célula es sinónimo de fuerza de expresión. Como tal, una expresión "fuerte" o "alta" equivale a niveles elevados de expresión del TCR en la superficie de la célula. La expresión "débil" o "baja" equivale a niveles bajos de expresión del TCR en la superficie de la célula.

Aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula significa que un TCR que comprende al menos un residuo de aminoácido de acuerdo con la presente invención tiene un mayor nivel de expresión en la superficie de la célula en relación con un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal. Un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal se relaciona con un TCR que no ha sido alterado para comprender un residuo de aminoácido de acuerdo con la presente invención, es decir, el TCR inalterado tiene el residuo de aminoácido de tipo silvestre en la posición específica.

En una realización, el presente TCR modificado puede tener una expresión en la superficie de la célula que es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de la línea germinal no modificada.

La expresión de un TCR en la superficie de la célula puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de un TCR en la superficie de la célula se puede determinar usando métodos de citometría de flujo convencionales conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Shapiro; Practical Flow Cytometry; John 2005; Science).

Por ejemplo, la expresión de un TCR en la superficie de la célula se puede expresar como la intensidad fluorescente media (MFI) de la expresión del TCR en una población de células (véase Shapiro; como se citó anteriormente). En una realización, la MFI de una población de células que expresan el presente TCR modificado puede ser al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que la MFI de una población correspondiente de células que expresan el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de la línea germinal no modificada.

La expresión de un TCR en la superficie de la célula se puede expresar como el porcentaje de células dentro de una población que expresa el TCR en la superficie de la célula. Dicho porcentaje se puede determinar usando métodos de citometría de flujo convencionales como es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Shapiro; como se citó anteriormente y Henel et al.; 2007; Lab Medicine; 38; 7; 428-436).

En una realización, el presente TCR modificado puede expresarse por al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60 o al menos un 70 % más de células en una población en comparación con el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de línea germinal no modificada.

En una realización, la expresión en la superficie de la célula del TCR modificado aumenta en comparación con el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de línea germinal no modificada, pero el nivel relativo del ARNm que codifica el TCR modificado o el TCR de línea germinal no modificado es esencialmente el mismo. Como se usa en el presente documento, "esencialmente igual" puede significar que los niveles de ARNm difieren, por ejemplo, en menos de 1.5 veces. Los niveles relativos de ARNm pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica;

por ejemplo, ensayos de ARN por RT-qPCR, transferencia Northern y citometría de flujo (por ejemplo, como se demuestra en la Figura 17).

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un TCR modificado que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; P9 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;

en donde al menos un residuo de aminoácido no está presente en la secuencia de aminoácidos del TCR de la línea germinal correspondiente y en donde dicho TCR tiene un nivel mayor de expresión en la superficie de la célula cuando se expresa en una célula con relación a un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de línea germinal.

Al menos un residuo de aminoácido se puede seleccionar de una lista de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; y
R43 de la cadena β.

En una realización, al menos un residuo de aminoácido se puede seleccionar de una lista de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
V19 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α; y
S86 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender L96 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender L96 de la cadena α y al menos uno de R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender L96 de la cadena α; R9 de la cadena β y Y10 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender V19 de la cadena α; R9 de la cadena β y Y10 de la cadena β.

El TCR modificado puede comprender R9 de la cadena β. En una realización, el TCR modificado puede comprender R9 de la cadena β y al menos uno de L96 de la cadena α; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β;

L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M1 1 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender Y10 de la cadena β. En una realización, el TCR modificado puede comprender Y10 de la cadena β y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender T24 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender T24 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el TCR modificado puede comprender V19 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender T20 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender T20 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender M50 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender M50 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender T5 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender T5 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender Q8 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender Q8 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender S86 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender S86 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M1 1 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender F39 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender F39 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M1 1 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender D55 de la cadena α. En una realización, el TCR modificado puede comprender D55 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El TCR modificado puede comprender R43 de la cadena β. En una realización, el TCR modificado puede comprender R43 de la cadena β y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

El término "al menos uno", tal como se utiliza en el presente documento, puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más residuos de aminoácidos como se describe en el presente documento.

El TCR modificado puede comprender una pluralidad de residuos de aminoácidos mencionados anteriormente. En otras palabras, el TCR puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 de los residuos de aminoácidos citados anteriormente.

El TCR modificado puede comprender R9 y Y10 en la cadena β.

En una realización, el TCR modificado puede comprender cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la

cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el TCR modificado puede comprender cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; y R43 de la cadena β.

En una realización, el TCR modificado puede comprender cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; y S86 de la cadena α.

Sustitución conservadora

La presente invención también abarca un TCR modificado que comprende una sustitución conservadora de un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; P9 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

Al menos un residuo de aminoácido puede seleccionarse de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; o
R43 de la cadena β.

Al menos un residuo de aminoácido puede ser cualquier residuo de aminoácido o una pluralidad de residuos de aminoácidos como se describe en el presente documento.

Se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos siempre que se mantenga una alta expresión del TCR. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofilicidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente de la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

La presente invención también abarca la sustitución homóloga (la sustitución y el reemplazo se usan en el presente documento para referirse al intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo), es decir, sustitución similar por similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc.

Secuencia de ácido nucleico

La presente invención proporciona además una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor del TCR modificado de la invención o una parte del mismo, por ejemplo la secuencia variable de la cadena α o la cadena β; la cadena α y/o la cadena β.

Tal como se utilizan en el presente documento, se pretende que los términos "polinucleótido", "nucleótido" y "ácido nucleico" sean sinónimos entre sí.

Un experto entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos pueden, usando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos aquí descritos para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que se vayan a expresar los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyan en su interior nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines del uso descrito en el presente documento, debe entenderse que los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de los polinucleótidos de interés.

La secuencia de nucleótidos puede ser bicatenaria o monocatenaria y puede ser ARN o ADN.

La secuencia de nucleótidos puede optimizarse con codones. Las diferentes células difieren en el uso de codones particulares. Este sesgo de codones corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo de célula. Al alterar los codones en la secuencia para que se adapten a la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión.

Muchos virus, incluido el VIH y otros lentivirus, utilizan una gran cantidad de codones raros y, al cambiarlos para que correspondan a los codones de mamíferos comúnmente utilizados, se puede lograr una mayor expresión de los componentes de empaquetamiento en células productoras de mamíferos. Las tablas de uso de codones son conocidas en la técnica para células de mamíferos, así como para una variedad de otros organismos.

La optimización de codones también puede implicar la eliminación de motivos de inestabilidad del ARNm y sitios de empalme crípticos.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que permite que tanto la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α como una secuencia de ácido nucleico una cadena β se expresen a partir del mismo transcrito de ARNm.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede comprender un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) entre las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena α y la cadena β. Un IRES es una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción en medio de una secuencia de ARNm.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y una secuencia de ácido nucleico una cadena β unidas por una secuencia de autoescisión interna.

La secuencia de autoescisión interna puede ser cualquier secuencia que permita separar el polipéptido que comprende la cadena α y el polipéptido que comprende la cadena β.

El sitio de escisión puede ser autoescindible, de modo que cuando se produce el polipéptido, se escinde inmediatamente en péptidos individuales sin necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

El término "escisión" se utiliza en el presente documento por conveniencia, pero el sitio de escisión puede provocar que los péptidos se separen en entidades individuales mediante un mecanismo distinto de la escisión clásica. Por ejemplo, para el péptido de autoescisión 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (véase más abajo), se han propuesto varios modelos para tener en cuenta la actividad de "escisión": proteólisis mediante una proteinasa de la célula huésped, autoproteólisis o una efecto traslacional (Donnelly et al. (2001) J. Gen. Virol. 82:1027-1041). El mecanismo exacto de tal "escisión" no es importante para los fines de la presente invención, siempre que el sitio de escisión,

cuando se coloca entre secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, haga que las proteínas sean expresadas como entidades separadas.

El péptido autoescindible puede ser un péptido autoescindible 2A de un aftovirus o un cardiovirus.

Vector

La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento.

El término "vector" incluye un vector de expresión, es decir, una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro/ex vivo*.

Los sistemas de administración viral incluyen, entre otros, un vector de adenovirus, un vector viral adenoasociado (AAV), un vector viral de herpes, un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral.

Los retrovirus son virus de ARN con un ciclo de vida diferente al de los virus líticos. En este sentido, un retrovirus es una entidad infecciosa que se replica a través de un intermediario de ADN. Cuando un retrovirus infecta una célula, su genoma se convierte en una forma de ADN mediante una enzima transcriptasa inversa. La copia de ADN sirve como plantilla para la producción de nuevos genomas de ARN y proteínas codificadas viralmente necesarias para el ensamblaje de partículas virales infecciosas.

Hay muchos retrovirus, por ejemplo el virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (MSV FBR), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (AEV) y todos los demás retroviridiae, incluidos los lentivirus.

Se puede encontrar una lista detallada de retrovirus en Coffin et al., ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, pp 758-763).

Los lentivirus también pertenecen a la familia de los retrovirus, pero pueden infectar células tanto en división como en no división (Lewis et al., (1992) EMBO J. 3053-3058).

El vector puede ser capaz de transferir un nucleótido de la invención a una célula, tal como una célula T. Idealmente, el vector debería ser capaz de una expresión sostenida de alto nivel en células T, de modo que el TCR introducido pueda competir exitosamente con el TCR endógeno por un conjunto limitado de moléculas de CD3.

El vector puede ser un vector retroviral. El vector puede basarse o derivarse de la estructura principal del vector MP71. Es posible que el vector carezca de una versión completa o truncada del elemento de respuesta a la hepatitis de la marmota (WPRE).

Para una infección eficaz de células humanas, las partículas virales pueden empaquetarse con envolturas anfotrópicas o envolturas del virus de la leucemia del mono gibón.

Aumentar el suministro de moléculas de CD3 puede aumentar la expresión del TCR en células modificadas genéticamente. Por lo tanto, el vector también puede comprender los genes para CD3-gamma, CD3-delta, CD3-épsilon y/o CD3-zeta. El vector puede comprender simplemente el gen de CD3-zeta. Los genes pueden estar unidos mediante secuencias de autoescisión, tales como la secuencia de autoescisión 2A. Alternativamente, se pueden proporcionar uno o más vectores separados que codifican el gen CD3 para la cotransferencia con el o los vectores que codifican TCR.

Célula

La presente invención se relaciona además con una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención. La célula puede expresar un receptor de células T de la invención.

La célula puede ser una célula T. La célula T puede ser cualquier subconjunto de células T, incluyendo, por ejemplo, células T αβ, células T γδ o células T reguladoras.

La célula puede ser una célula asesina natural.

La célula puede derivarse de una célula aislada de un sujeto. La célula puede ser parte de una población celular mixta aislada del sujeto, tal como una población de linfocitos de sangre periférica (PBL).

Las células T dentro de la población de PBL pueden activarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como el uso de anticuerpos anti-CD3 y CD28.

La célula T puede ser una célula T cooperadora CD4+ o una célula T citotóxica CD8+. La célula puede estar en una población mixta de células T cooperadoras CD4+/células T citotóxicas CD8+. La activación policlonal, por ejemplo utilizando anticuerpos anti-CD3 opcionalmente en combinación con anticuerpos anti-CD28, desencadenará la proliferación de células T CD4+ y CD8+, pero también puede desencadenar la proliferación de células T reguladoras CD4+25+.

En una realización, la célula T es una célula T citotóxica CD8+.

En una realización, una célula que expresa un TCR modificado de acuerdo con la presente invención puede tener una actividad funcional aumentada en comparación con una célula que expresa el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de la línea germinal no modificada.

El aumento de la actividad funcional puede referirse, por ejemplo, al aumento de la producción de citocinas por parte de la célula tras la unión del antígeno al TCR. La citocina puede seleccionarse de IFNγ, IL-2, GM-CSF, TNFalfa, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

La citocina puede ser IFNγ y/o IL-2.

Como se usa en el presente documento, "producción aumentada de citocinas" significa que, tras la unión del antígeno al TCR, la cantidad de citocina producida por una célula que expresa un TCR modificado de acuerdo con la presente invención es mayor que la cantidad producida por una célula equivalente que expresa el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de la línea germinal no modificada.

La cantidad de citocina producida por una célula que expresa un TCR modificado de acuerdo con la presente invención puede ser al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10, 20 o 50 veces mayor que la producida por una célula equivalente que expresa el TCR correspondiente que comprende la secuencia del TCR de la línea germinal no modificada.

La cantidad de citocina producida por una célula se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo o ELISA.

La presente invención también proporciona un método para producir una célula de acuerdo con la invención que comprende la etapa de transfectar o transducir una célula *in vitro* o *ex vivo* con un vector de acuerdo con la invención.

La célula puede aislarse del sujeto al que se va a transferir adoptivamente la célula modificada genéticamente. A este respecto, la célula se puede producir aislando una célula T de un sujeto, activando opcionalmente la célula T, la transferencia del gen del TCR ex vivo y la posterior inmunoterapia del sujeto mediante transferencia adoptiva de las células transducidas con TCR.

Alternativamente, la célula puede aislarse de un sujeto diferente, de modo que sea alogénica. La célula puede aislarse de un sujeto donante. Por ejemplo, si el sujeto se somete a un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénica (Alo - HSCT), la célula puede derivarse del donante, del cual se derivan las HSC. Si el sujeto está siendo sometido o ha sido sometido a un trasplante de órgano sólido, la célula puede derivarse del sujeto del que se derivó el órgano sólido.

Alternativamente, la célula puede ser, o derivarse de, una célula madre, tal como una célula madre hematopoyética (HSC). La transferencia de genes a HSC no conduce a la expresión del TCR en la superficie de la célula, ya que las células madre no expresan las moléculas de CD3. Sin embargo, cuando las células madre se diferencian en precursores linfoides que migran al timo, el inicio de la expresión de CD3 conduce a la expresión superficial del TCR introducido en los timocitos. Una ventaja de este enfoque es que las células T maduras, una vez producidas, expresan sólo el TCR introducido y pocas o ninguna cadena del TCR endógena, porque la expresión de las cadenas del TCR introducidas suprime el reordenamiento de los segmentos del gen TCR endógeno para formar genes funcionales de TCR alfa y beta.

Un beneficio adicional es que las células madre modificadas genéticamente son una fuente continua de células T maduras con la especificidad antigénica deseada. Por lo tanto, la célula puede ser una célula madre genéticamente modificada que, tras la diferenciación, produce una célula T que expresa un TCR de la invención. La presente invención también proporciona un método para producir una célula T que expresa un TCR de la invención induciendo la diferenciación de una célula madre que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

Una desventaja del enfoque de células madre es que los TCR con la especificidad deseada pueden eliminarse durante el desarrollo de las células T en el timo o pueden inducir tolerancia cuando se expresan en células T periféricas. Otro posible problema es el riesgo de mutagénesis por inserción en las células madre.

Composición farmacéutica

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un vector o una célula de acuerdo con la presente invención.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para infusión intravenosa.

Uso

La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

"Tratamiento" se relaciona con el uso terapéutico de las células de la presente invención. En el presente documento, las células pueden administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

"Prevención" se relaciona con el uso profiláctico de las células de la presente invención. En el presente documento dichas células pueden administrarse a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para prevenir o alterar la causa de la enfermedad o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad. El sujeto puede tener predisposición a padecer la enfermedad o pensar que corre riesgo de desarrollarla.

La presente invención también proporciona el uso de un TCR modificado; una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención para aumentar la expresión en la superficie de la célula del TCR.

La presente invención también describe el uso de un TCR modificado; una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención para aumentar la actividad funcional de una célula. La actividad funcional puede ser cualquier actividad funcional como se describe en el presente documento.

Método de tratamiento

La presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad que comprende la etapa de administrar las células de la presente invención (por ejemplo en una composición farmacéutica como se describe anteriormente) a un sujeto.

El método puede implicar las etapas de:

(i) aislar una muestra que contiene células;
(ii) transducir o transfectar dichas células con una secuencia de ácido nucleico o un vector proporcionado por la presente invención;
(iii) administrar las células de (ii) a un sujeto.

La presente invención también proporciona una célula de la presente invención para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

En una realización preferida de la presente invención, el sujeto de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento es un mamífero, preferiblemente un gato, perro, caballo, burro, oveja, cerdo, cabra, vaca, ratón, rata, conejo o cobaya, pero lo más preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Para la administración de células como se describe en el presente documento, se puede usar cualquier modo de administración de la población celular que sea común o estándar en la técnica, por ejemplo, inyección o infusión, por una vía adecuada. En un aspecto se administran hasta 5×10^8 células por kg en humanos. Por lo tanto, por ejemplo, un ser humano con un peso corporal de 100 kg puede recibir una dosis de hasta 5×10^{10} células por tratamiento. La dosis se puede repetir en momentos posteriores si es necesario.

En el presente documento se describe el uso de un vector o una célula de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

Enfermedad

La enfermedad a tratar y/o prevenir mediante los usos de la presente invención puede ser cualquier enfermedad que induzca una respuesta inmune mediada por células T.

Por ejemplo, la enfermedad a tratar y/o prevenir mediante los usos de la presente invención puede ser una enfermedad cancerosa, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

La enfermedad a tratar y/o prevenir mediante los usos de la presente invención puede ser una infección, por ejemplo una infección bacteriana o viral.

Método

La presente invención proporciona además un método para aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;
(ii) determinar un residuo de aminoácido de la cadena α y/o cadena β del TCR en una o más posiciones seleccionadas de:

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; 20 de la cadena α; 50 de la cadena α; 5 de la cadena α; 8 de la cadena α; 86 de la cadena α; 39 de la cadena α; 55 de la cadena α; 43 de la cadena β; 66 de la cadena α; 19 de la cadena β; 21 de la cadena β; 103 de la cadena β; 3 de la cadena α; 7 de la cadena α; 9 de la cadena α; 11 de la cadena α; 16 de la cadena α; 18 de la cadena α; 21 de la cadena α; 22 de la cadena α; 26 de la cadena α; 4o de la cadena α; 47 de la cadena α; 48 de la cadena α; 49 de la cadena α; 51 de la cadena α; 52 de la cadena α; 53 de la cadena α; 67 de la cadena α; 68 de la cadena α; 74 de la cadena α; 76 de la cadena α; 79 de la cadena α; 81 de la cadena α; 83 de la cadena α; 90 de la cadena α; 92 de la cadena α; 93 de la cadena α; y 101 de la cadena α; y

(iii) alterar el residuo de aminoácido en una o más de las posiciones enumeradas en la etapa (ii) con un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α,

y en donde el método no es un método para el tratamiento de un cuerpo humano o de animal.

Como se describe en el presente documento, la secuencia de la línea germinal de cada gen variable se conoce en la técnica (véase Scaviner & Lefranc; como se citó anteriormente y Folch & Lefranc; como se citó anteriormente) y el segmento V de la línea germinal Vα y/o Vβ utilizado en un TCR puede por lo tanto determinarse mediante secuenciación y comparación con las secuencias de la línea germinal conocidas (véase, por ejemplo, Hodges et al.; como se citó anteriormente, Zhou et al.; 2006; como se citó anteriormente). Por lo tanto, la presente etapa de determinar un residuo de aminoácido de la cadena α y/o cadena β del TCR en una o más posiciones se relaciona específicamente con la determinación del residuo de aminoácido que está presente en una o más de las posiciones particulares descritas en el presente documento.

El método puede comprender determinar el residuo de aminoácido presente en cualquier posición o pluralidad de posiciones como se describe en el presente documento.

La secuencia de aminoácidos del TCR puede alterarse de modo que comprenda cualquier residuo de aminoácido o cualquier pluralidad de residuos de aminoácidos como se describe en el presente documento.

En una realización, la invención proporciona un método para aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula que comprende la etapa de alterar una secuencia de aminoácidos del TCR de modo que comprenda al menos un residuo seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68

de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

Al menos un residuo de aminoácido puede seleccionarse de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
V19 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; o
R43 de la cadena β.

La secuencia de aminoácidos del TCR puede alterarse de modo que comprenda una pluralidad de residuos de aminoácidos como se definió anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de un TCR puede alterarse usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del TCR puede ser mutagénesis alterada de una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR.

Aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula significa que un TCR que comprende al menos un residuo de aminoácido de acuerdo con la presente invención tiene un mayor nivel de expresión en la superficie de la célula en relación con un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal. Un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal se refiere a un TCR que no ha sido alterado para comprender un residuo de aminoácido de acuerdo con la presente invención, es decir, el TCR inalterado tiene el residuo de aminoácido de tipo silvestre en la posición específica.

La expresión de un TCR en la superficie de la célula se puede determinar usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

La presente invención se relaciona además a un método para seleccionar un TCR, que cuando se expresa en una célula, tiene un alto nivel de expresión en la superficie de la célula, cuyo método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un grupo de secuencias de aminoácidos del TCR; y
(ii) seleccionar una secuencia de aminoácidos del TCR que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena α; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

Al menos un residuo de aminoácido puede seleccionarse de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
V19 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;

D55 de la cadena α; o
R43 de la cadena β.

El método puede comprender la etapa de seleccionar un TCR que comprende cualquier residuo de aminoácido o cualquier pluralidad de residuos de aminoácido como se definió anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel de expresión en la superficie de la célula de un TCR que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR; y
(ii) (ii) determinar si la secuencia del TCR comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;

en donde se determina que una secuencia que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos enumerados es un TCR de alta expresión y se determina que una secuencia que no comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos enumerados es un TCR de baja expresión.

Al menos un residuo de aminoácido puede seleccionarse de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
V19 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; o
R43 de la cadena β.

La secuencia de cadena α y/o cadena β puede ser una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y/o una cadena β.

El método puede comprender determinar el residuo de aminoácido presente en cualquier posición o pluralidad de posiciones como se describe en el presente documento.

Un método de este tipo es útil para predecir el nivel de expresión superficial de un TCR, por ejemplo un TCR terapéutico, cuando se expresa como un TCR exógeno en una célula, por ejemplo una célula T.

Producto de programa informático

La Figura 12 ilustra esquemáticamente un dispositivo 100 informático de propósito general del tipo que puede usarse para implementar las técnicas descritas anteriormente. En el contexto de la presente invención, esto podría ser, por ejemplo, un procesador integrado que forme parte de un sistema más grande. El dispositivo 100 informático de propósito general incluye una unidad 102 de procesamiento central, una memoria 104 de acceso aleatorio y una memoria 106 de sólo lectura, conectadas entre sí a través del bus 122. También comprende además una tarjeta 108 de interfaz de red, una unidad 110 de disco duro, un controlador 112 de pantalla y monitor 114 y un circuito 116 de entrada/salida de usuario con un teclado 118 y un ratón 120, todos conectados a través del bus 122 común. En funcionamiento, como cuando forma parte de un sistema más grande, la unidad 102 de procesamiento central ejecutará instrucciones de programa de ordenador que pueden, por ejemplo, almacenarse en la memoria 104 de acceso aleatorio y/o en la memoria 106 de sólo lectura. Las instrucciones del programa podrían recuperarse adicionalmente de la unidad 110 de disco duro o descargarse dinámicamente a través de la tarjeta 108 de interfaz de red. Los resultados del procesamiento realizado pueden ser mostrados a un usuario o un ingeniero a través de un controlador 112 de pantalla conectado y un monitor 114. Las entradas de usuario para controlar el funcionamiento del dispositivo 100 informático de propósito general pueden recibirse a través de un circuito 116 de entrada y salida de

usuario conectado desde el teclado 118 o el ratón 120. Se apreciará que el programa informático podría escribirse en una variedad de lenguajes informáticos diferentes. El programa informático puede almacenarse localmente en un medio de registro o descargarse dinámicamente al dispositivo 100 informático de propósito general. Cuando funciona bajo el control de un programa informático apropiado, el dispositivo 100 informático de propósito general puede realizar las técnicas descritas anteriormente y se puede considerar que forma un aparato para realizar cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. La arquitectura del dispositivo 100 informático de uso general podría variar considerablemente y la Figura 13 es sólo un ejemplo. El dispositivo 100 informático de propósito general también puede tener una configuración que le permita proporcionar un entorno de ejecución de instrucciones (es decir, una máquina virtual).

La invención se describirá ahora con más detalle a través de Ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden de ninguna manera limitar la alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Determinación de segmentos variables del TCR que se correlacionan con una expresión del TCR fuerte o débil

Después de la transducción de células T con TCR, los TCR introducidos difieren mucho en su capacidad para expresarse en la superficie de la célula en relación con los TCR endógenos. Los TCR exógenos fuertemente expresados se coexpresan con el TCR endógeno o incluso pueden superar al TCR endógeno por la expresión en la superficie de la célula. Los TCR exógenos débilmente expresados están ausentes en la superficie de la célula o se expresan pobremente cuando se coexpresan con un TCR fuerte (Figura 1A).

Las células T primarias activadas se transdujeron con un vector pMP71 que codifica el TCR de WT1 (tumor de Wilms 1), que contiene un dominio constante murinizado y una cisteína adicional en el dominio constante (el TCR completo era de codón optimizado).

Este TCR de WT1 modificado muestra dominancia del TCR (Figura 2). 72 horas después de la transducción, las células T se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y CD8 y anticuerpos de dominio constante anti-TCR humano y anti-TCR murino. Las células T se seleccionaron en la población de células T CD3+ y CD8+. Las células T CD8+ que expresan TCR endógenos fuertes se tiñen conjuntamente con los anticuerpos de dominio constante anti-TCR murino y anti-TCR humano. Las células T CD8+ que expresan TCR endógenos débiles se tiñen sólo con los anticuerpos de dominio constante anti-TCR murino.

Las poblaciones de células T CD8+ que expresaban los TCR endógenos fuertes y débiles se clasificaron y clonaron mediante FAC para determinar su uso variable de las cadenas αlfa y beta. En la tabla que se muestra en la Figura 3 se muestra (i) el número total de segmentos variables alfa y beta fuertes y débiles que se secuenciaron y (ii) los segmentos variables alfa y segmentos variables beta que muestran dominancia en la población de TCR endógeno fuerte o débil, junto con el número total de cada uno de los segmentos variables dentro de cada población. Los segmentos alfa y beta se han clasificado utilizando la nomenclatura IMGT.

Ejemplo 2 - Expresión del TCR genéricos fuertes y débiles en entornos competitivos y no competitivos.

Los datos de clonotipado se usaron para determinar los segmentos variables alfa y beta utilizados con mayor frecuencia en las poblaciones del TCR fuertes y débiles. Se modificaron TCR genéricos fuertes y débiles utilizando esta información.

El TCR fuerte es la variable alfa 38.2 y la variable beta 7.8. El TCR débil es la variable alfa 13.2 y la variable beta 7.3. Como los anticuerpos monoclonales no están disponibles comercialmente para los segmentos variables alfa y beta anteriores, para determinar la expresión del TCR en células T transducidas está presente una etiqueta V5 al inicio de la cadena αlfa y una etiqueta Myc al comienzo de la cadena beta. cadena. Además, para poder normalizar la eficiencia de la transducción, está presente un CD19 murino truncado al final de las construcciones (Figura 4).

Las dos construcciones contenían los mismos dominios constantes alfa y beta y toda la construcción no estaba optimizada sin codones. Además, los sitios de restricciones únicos bordean los segmentos alfa y beta para permitir un fácil intercambio de los segmentos alfa y beta. Los TCR se clonan en el retrovirus pMP71 para experimentos de transducción.

Expresión de TCR fuertes y débiles en un entorno no competitivo

Se transdujeron células Jurkat que no contienen cadenas αlfa o beta del TCR endógenas con vectores pMP71 que codifican los TCR fuertes o débiles genéricos. 72 horas después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5 y etiqueta Myc (Figura 5). Las células Jurkat se seleccionaron para la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión de la etiqueta V5 y la etiqueta Myc en estas células de alta expresión CD19+. Además, también se determinó la MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc para las células de alta expresión CD19+.

Expresión de TCR fuertes y débiles en un entorno competitivo

Se transdujeron células Jurkat que expresaban el TCR de WT1 modificado con vectores pMP71 que codificaban los TCR fuertes o débiles genéricos. 72 horas después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5 y etiqueta Myc (Figura 6). Las células Jurkat se seleccionaron en función de la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión de la etiqueta V5 y la etiqueta Myc. También se determinó la MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc para las células de alta expresión CD19+.

Expresión de TCR fuertes y débiles en células Jurkat que expresan una expresión baja, media y alta del TCR de WT1 modificado.

Las células Jurkat que expresan el TCR de WT1 modificado se transdujeron con vectores pMP71 que codifican los TCR fuertes o débiles genéricos. 72 horas después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, dominio constante del TCR murino, etiqueta V5 y etiqueta Myc (Figura 7). Las células Jurkat se seleccionaron primero para una expresión alta de CD19 y luego para una expresión alta, media y baja del dominio constante del TCR murino. Para las tres poblaciones separadas de TCR de WT1 y las células que expresan WT1 en su conjunto, se determinó la expresión de etiqueta V5 y etiqueta Myc. También se determinó la MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc.

Ejemplo 3 - Análisis bioinformático para identificar características clave que se correlacionan con la fuerza de la expresión del TCR.

La información de secuenciación del clonotipado se usó para comparar todos los residuos en cada posición para todos los TCR fuertes y débiles que se habían secuenciado. Después de la alineación del TCR, los residuos que tuvieron una alta aparición en posiciones particulares en el TCR fuerte, en comparación con el TCR débil, se indican (*) en la figura usando TRAV38-1 como ejemplo (Figura 8A).

Los residuos que mostraron prevalencia en el TCR fuerte se analizaron y refinaron más a fondo para incluir solo residuos en las regiones marco que tienen implicaciones en la estabilización de la estructura y el emparejamiento de las cadenas del TCR. Estos residuos están resaltados (*) utilizando TRAV38-2 y TRBV7-8 como cadena principal (Figura 8B). La línea superior son los residuos del TCR fuerte. La línea inferior son los residuos equivalentes en el TCR débil.

Ejemplo 4 - Modificación de los TCR de expresión fuerte y expresión débil

Para modificar el TCR de expresión fuerte con residuos débiles, se usó el TCR fuerte como cadena principal y todos los residuos fuertes que se consideraban importantes en la fuerza del TCR se reemplazaron con los residuos del TCR débiles en la posición relevante.

Para modificar el TCR débil con residuos fuertes, se usó el TCR débil como cadena principal y todos los residuos fuertes que se consideraban importantes en la resistencia del TCR se reemplazaron con residuos del TCR débiles en la posición relevante.

Las células Jurkat sin TCR (fila superior) y las células Jurkat que expresan el TCR murinizado WT1 (fila inferior) se transdujeron con el TCR indicado y 72 horas después se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5 y etiqueta Myc. Las células Jurkat se seleccionaron en función de la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión de la etiqueta V5 y la etiqueta Myc. También se determinaron la MFI de la etiqueta V5 y la etiqueta Myc para las células de alta expresión CD19+ (Figura 9).

Ejemplo 5 - Efecto de la mutación de residuos individuales sobre la expresión del TCR

El efecto individual de los residuos fuertes sobre la expresión del TCR

Se usó el TCR débil genérico como cadena principal y se usó la técnica de mutagénesis por PCR de cambio rápido para preparar una serie del TCR que tenían sólo uno de los residuos fuertes predichos que reemplazaban el residuo del TCR débil en la posición relevante mientras retenían el resto de la cadena principal del TCR débil.

Los TCR mutados están etiquetados de modo que la letra representa el aminoácido, el número es la posición en el marco del TCR y la α o β indica si el residuo está en la cadena αlfa o la cadena beta. El último gráfico, fila inferior, lado derecho, tiene 3 cambios de residuos, V19 en la cadena αlfa y R9, Y10 en la cadena beta (Figuras 10 y 11).

Las células Jurkat sin TCR (Figura 10) y las células Jurkat que expresan el TCR VVT1 modificado (Figura 11), se transdujeron con el retrovirus pMP71 que codifica el TCR indicado. 72 horas después de la transducción, las células transducidas se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5 y etiqueta Myc. Las células se seleccionaron según la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión de la etiqueta V5 y la etiqueta Myc.

La Figura 13 muestra los resultados de experimentos en los que células Jurkat sin TCR (A) y células Jurkat que expresan el TCR de WT1 modificado (B) se transdujeron con el retrovirus pMP71 que codifica los TCR indicados. 72 horas después de la transducción, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5, etiqueta Myc y TCR beta constante murino. Las células se seleccionaron según la expresión alta de CD19 y se determinó la expresión del TCR beta constante murino Tag etiqueta V5, etiqueta Myc y murino. También se determinaron la MFI de etiqueta V5, etiqueta Myc y la expresión del TCR beta constante murino para las células de alta expresión CD19+. (C) MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc para células Jurkat sin TCR. (D) MFI de etiqueta V5, etiqueta Myc y TCR beta constante murino para células Jurkat que expresan el TCR de WT1 modificado.

Los resultados muestran que F39 de la cadena α, D55 de la cadena α y R43 de la cadena β aumentan la expresión superficial de la TCR. Además, también se demostró que la mutación de los tres residuos anteriores disminuye la cantidad del TCR de WT1 expresado en la superficie de la célula en experimentos de competencia con células Jurkat.

Ejemplo 6 - Efecto de la mutación de residuos de dominio variable con L96α, R9β y Y10β en TCR específicos de antígeno

Expresión en la superficie de la célula en células Jurkat

Se transdujeron células Jurkat (que no contienen cadenas αlfa o beta del TCR endógeno) con vectores pMP71 que codifican cualquiera de los TCR de CMV o WT1 de tipo silvestre no modificados, o los mismos TCR que fueron mutados para contener L96α, R9β y Y10β. 72 h después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con Abs anti-CD19 y Abs con tetrámero de CMV o Vβ2.1 (para determinar la expresión beta variable de WT1).

Las células primero se seleccionaron según la expresión alta de CD19 y luego se determinó la expresión del tetrámero de CMV y/o de Vβ2.1 (Figura 14).

Expresión en la superficie de la célula en células T primarias

Las células T primarias activadas se transdujeron con vectores pMP71 que codificaban TCR de CMV o WT1 de tipo silvestre no modificado, o los mismos TCR que se mutaron para contener L96α, R9β y Y10β. 72 h después de la transducción, las células T se tiñeron con Abs anti-CD3, CD8 y CD19 y Abs del tetrámero de CMV o Vβ2.1. Las células se seleccionaron en células T CD3+ y altas en CD19 y luego se determinó la expresión del TCR usando tetrámeros o anticuerpos anti- Vβ2.1 para detectar TCR de CMV y WT1, respectivamente (Figura 15).

Se transdujeron células T primarias activadas con vectores pMP71 que codifican CMV de tipo silvestre no modificado o el mismo TCR mutado para contener L96α, R9β y Y10β. Cinco días después de la transducción, las células T se cultivaron conjuntamente con las APC que expresaban el péptido pCMV o el péptido irrelevante pVVT235. Después de 18 h de cocultivo, se recogió el sobrenadante y se determinó mediante ELISA la producción de IL-2 e IFN- γ (Figura 16).

Las células transducidas con TCR bien expresados y mal expresados contienen cantidades similares de ARNm del TCR.

Las células Jurkat, sin TCR endógenos, se transdujeron con vectores pMP71 que codifican el TCR fuerte genérico o el TCR débil genérico, o el TCR fuerte genérico que contiene los residuos débiles predichos, o el TCR débil genérico que contiene los residuos fuertes predichos. Se utilizó el ensayo de ARN Affymetrix Primeflow para determinar el porcentaje de células con alto contenido de CD19+ que expresan el ARNm alfa constante y el ARNm beta constante. Se determinó la MFI del ARNm alfa y beta constante para las cuatro poblaciones. Además, también se determinó el porcentaje de células Jurkat con alto contenido de CD19+ que expresan la etiqueta V5 (Figura 17).

Ejemplo 7 - Contribución del TCRα frente a TCRβ a la expresión en la superficie de la célula del TCR

Se transdujeron células Jurkat, sin TCR endógenos, con vectores pMP71 que codifican el TCR fuerte o el TCR débil, o un TCR modificado para contener la cadena variable alfa fuerte y la cadena variable beta débil, o un TCR modificado para contener la cadena variable alfa débil y la cadena variable beta fuerte. 72 h después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, etiqueta V5 y etiqueta Myc. Las células Jurkat se seleccionaron en CD19 alto y se determinó la expresión de etiqueta V5 y etiqueta Myc. El MFI de etiqueta V5 y etiqueta Myc también se determinó en las células con alto contenido de CD19+ (Figura 18).

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de células T (TCR) modificado que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; P9 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;
en donde al menos un residuo de aminoácido no está presente en la secuencia de aminoácidos del TCR de la línea germinal correspondiente y donde dicho TCR tiene un mayor nivel de expresión en la superficie de la célula cuando se expresa en una célula en relación con un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de línea germinal.

2. Un TCR modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un residuo de aminoácido se selecciona de:

L96 de la cadena α;
R9 de la cadena β;
Y10 de la cadena β;
T24 de la cadena α;
T20 de la cadena α;
M50 de la cadena α;
T5 de la cadena α;
Q8 de la cadena α;
S86 de la cadena α;
F39 de la cadena α;
D55 de la cadena α; o
R43 de la cadena β.

3. Un TCR modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un residuo de aminoácido se selecciona de:

(i) L96 de la cadena α;
(ii) R9 de la cadena β;
(iii) Y10 de la cadena β; y/o
(iv) T24 de la cadena α;

4. Un TCR modificado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos, tales como:

(i) que comprende V19 de la cadena α y al menos un residuo de aminoácido como se define en la reivindicación 1;
(ii) que comprende L96 de la cadena α; R9 de la cadena β y Y10 de la cadena β;
(iii) que comprende V19 de la cadena α; R9 de la cadena β y Y10 de la cadena β;
(iv) que comprende cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α y R43 de la cadena β;
(v) que comprende cada uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; o
(vi) que comprende cada uno de: L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y/o una cadena β del TCR como se define en cualquier reivindicación anterior; por ejemplo en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena β se enlazan mediante una secuencia de autoescisión interna o

un sitio de entrada al ribosoma interno.

6. Un vector, tal como un vector de retrovirus, un vector de lentivirus o un transposón, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6, por ejemplo en donde la célula es una célula T, una célula asesina natural o una célula madre, en particular en donde la célula se deriva de una célula T, una célula asesina natural o una célula madre aislada de un sujeto.

8. Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o una célula que expresa un TCR como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

10. Un método para producir una célula de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende la etapa de transducir una célula *in vitro* o *ex vivo* con un vector de acuerdo con la reivindicación 6.

11. Un método para aumentar la expresión de un TCR en la superficie de la célula que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;
(ii) determinar un residuo de aminoácido de la cadena α y/o la cadena β del TCR en una o más posiciones seleccionadas de:

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; 20 de la cadena α; 50 de la cadena α; 5 de la cadena α; 8 de la cadena α; 86 de la cadena α; 39 de la cadena α; 55 de la cadena α; 43 de la cadena β; 66 de la cadena α; 19 de la cadena β; 21 de la cadena β; 103 de la cadena β; 3 de la cadena α; 7 de la cadena α; 9 de la cadena α; 11 de la cadena α; 16 de la cadena α; 18 de la cadena α; 21 de la cadena α; 22 de la cadena α; 26 de la cadena α; 40 de la cadena α; 47 de la cadena α; 48 de la cadena α; 49 de la cadena α; 51 de la cadena α; 52 de la cadena α; 53 de la cadena α; 67 de la cadena α; 68 de la cadena α; 74 de la cadena α; 76 de la cadena α; 79 de la cadena α; 81 de la cadena α; 83 de la cadena α; 90 de la cadena α; 92 de la cadena α; 93 de la cadena α; y 101 de la cadena α; y

(iii) alterar el residuo de aminoácido en una o más posiciones enumeradas en la etapa (ii) con un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α,
y en donde el método no es un método para el tratamiento de un cuerpo humano o de animal, preferiblemente en donde la secuencia de aminoácidos del TCR se altera por mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR.

12. Un método para seleccionar un TCR que cuando se expresa en una célula, tiene un alto nivel de expresión en la superficie de la célula, cuyo método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un grupo de secuencias de aminoácidos del TCR; y
(ii) seleccionar una secuencia de aminoácido del TCR que comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

13. Un método para seleccionar un TCR que cuando se expresa en una célula, tiene un alto nivel de expresión en la superficie de la célula, cuyo método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un grupo de secuencias de aminoácidos del TCR; y
(ii) seleccionar una secuencia de aminoácidos del TCR que comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos como se define en la reivindicación 12;
por ejemplo en donde la secuencia de aminoácidos del TCR seleccionada en la etapa (ii) comprende uno o más residuos de aminoácidos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. Un método para determinar el nivel de expresión de un TCR en la superficie de la célula que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR; y
(ii) determinar si la secuencia del TCR comprende al menos un residuo de aminoácido seleccionado de:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;
en donde una secuencia que comprende al menos uno de los residuos de aminoácido mencionados se determina que es un TCR de expresión alta en la superficie de la célula y se determina que una secuencia que no comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mencionada es un TCR de expresión baja en la superficie de la célula.

15. Uso de un TCR modificado que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácido:

L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;
en donde al menos un residuo de aminoácido no esta presente en la correspondiente secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal; un TCR modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α y/o una cadena β de dicho TCR modificado o un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α y/o una cadena β de dicho TCR modificado para aumentar la expresión en la superficie de la célula del TCR, y en donde el uso no es un método para tratamiento del cuerpo humano o de un animal.

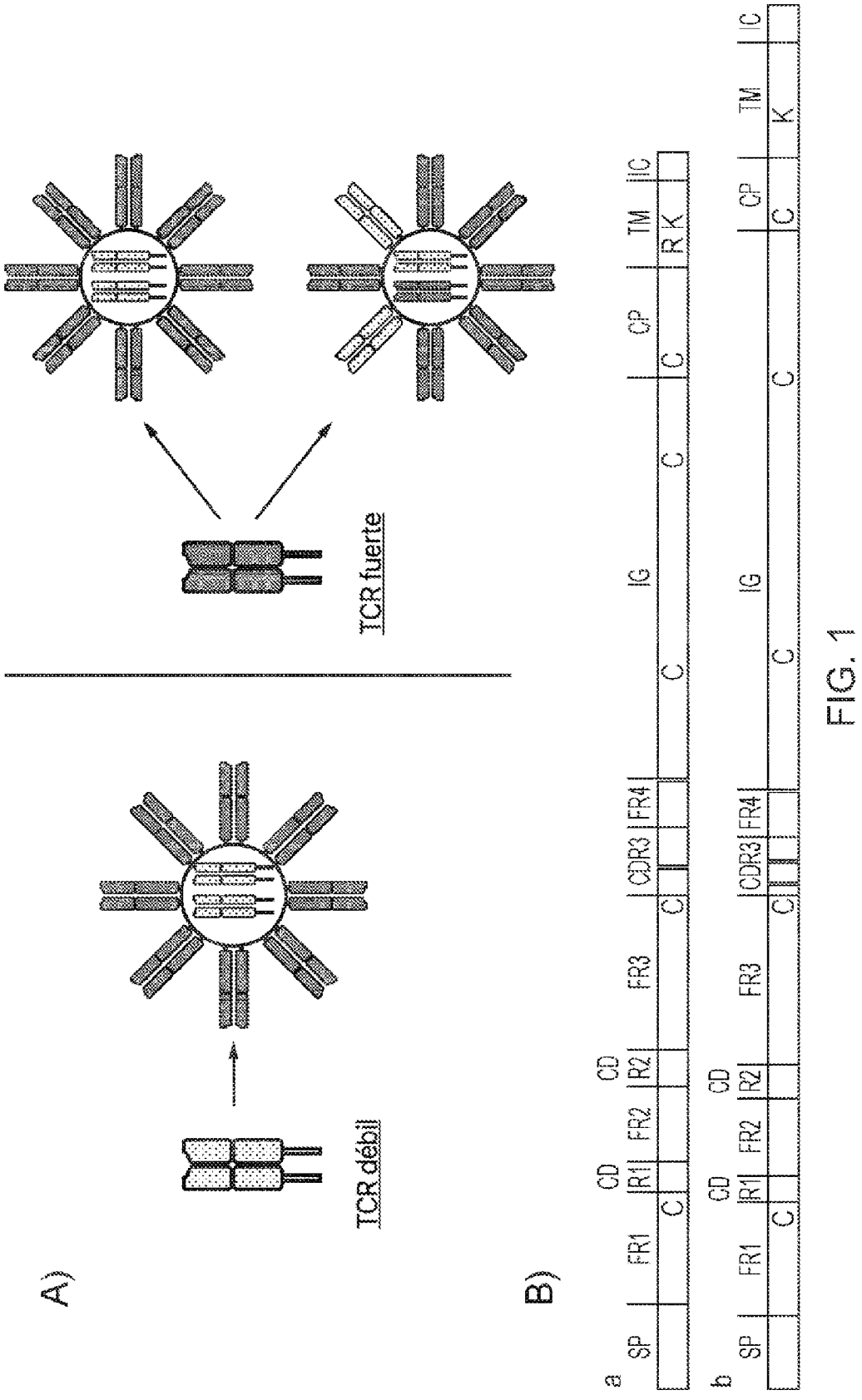

A)
TCR débil
TCR fuerte
B)
a
SP
FR1
CD
IR1
FR2
CD
R2
FR3
C
CDR3
FR4
C
IG
C
CP
TM
IC
R K
b
SP
FR1
CD
IR1
FR2
CD
R2
FR3
C
CDR3
FR4
C
IG
C
CP
TM
IC
C
K

FIG. 1

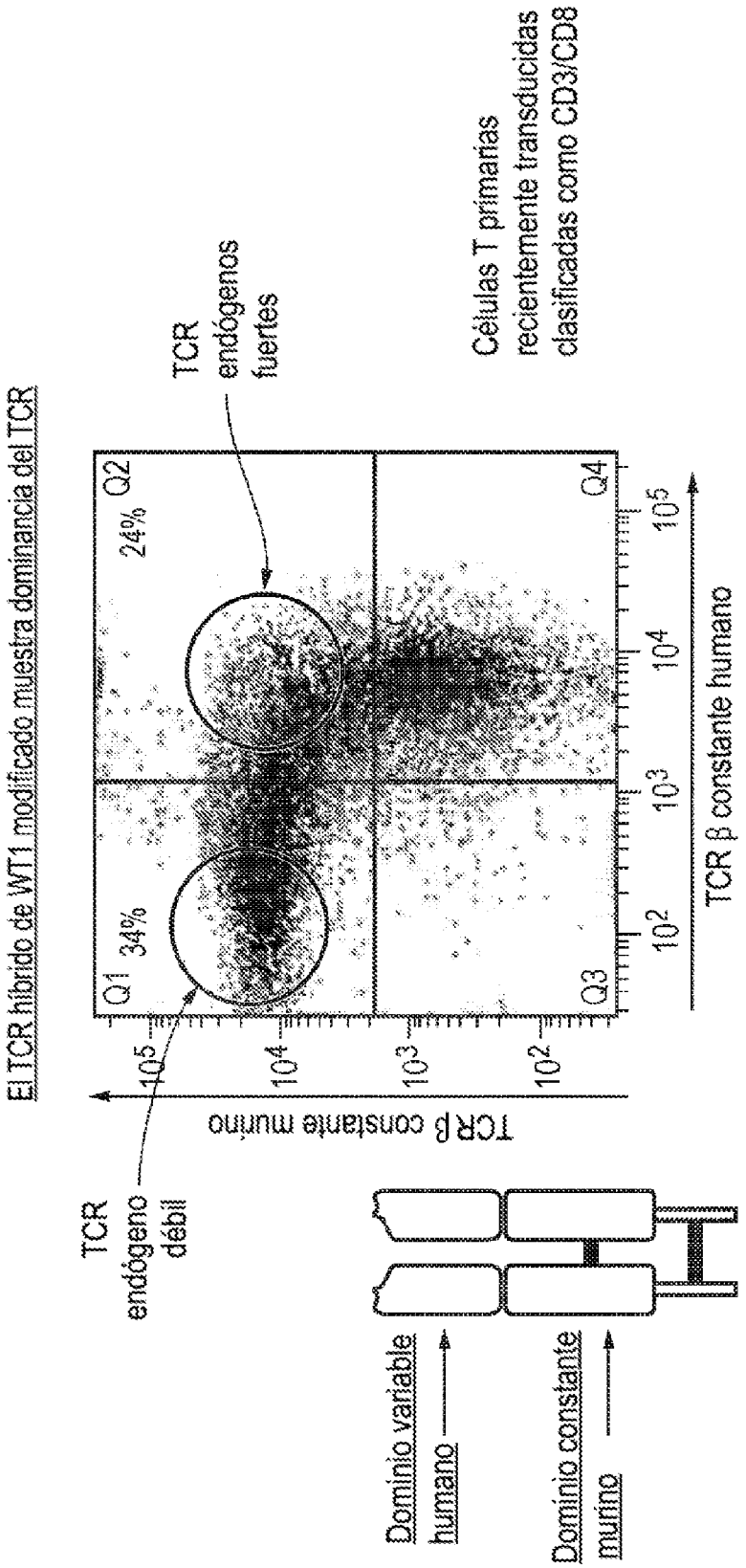

El TCR híbrido de WT1 modificado muestra dominancia del TCR
TCR endógeno débil
TCR endógenos fuertes
Células T primarias recientemente transducidas clasificadas como CD3/CD8
TCR β constante murino
TCR β constante humano
Q1 34%
Q2 24%
Q3
Q4
10^2
10^3
10^4
10^5
Dominio variable humano
Dominio constante murino

FIG. 2

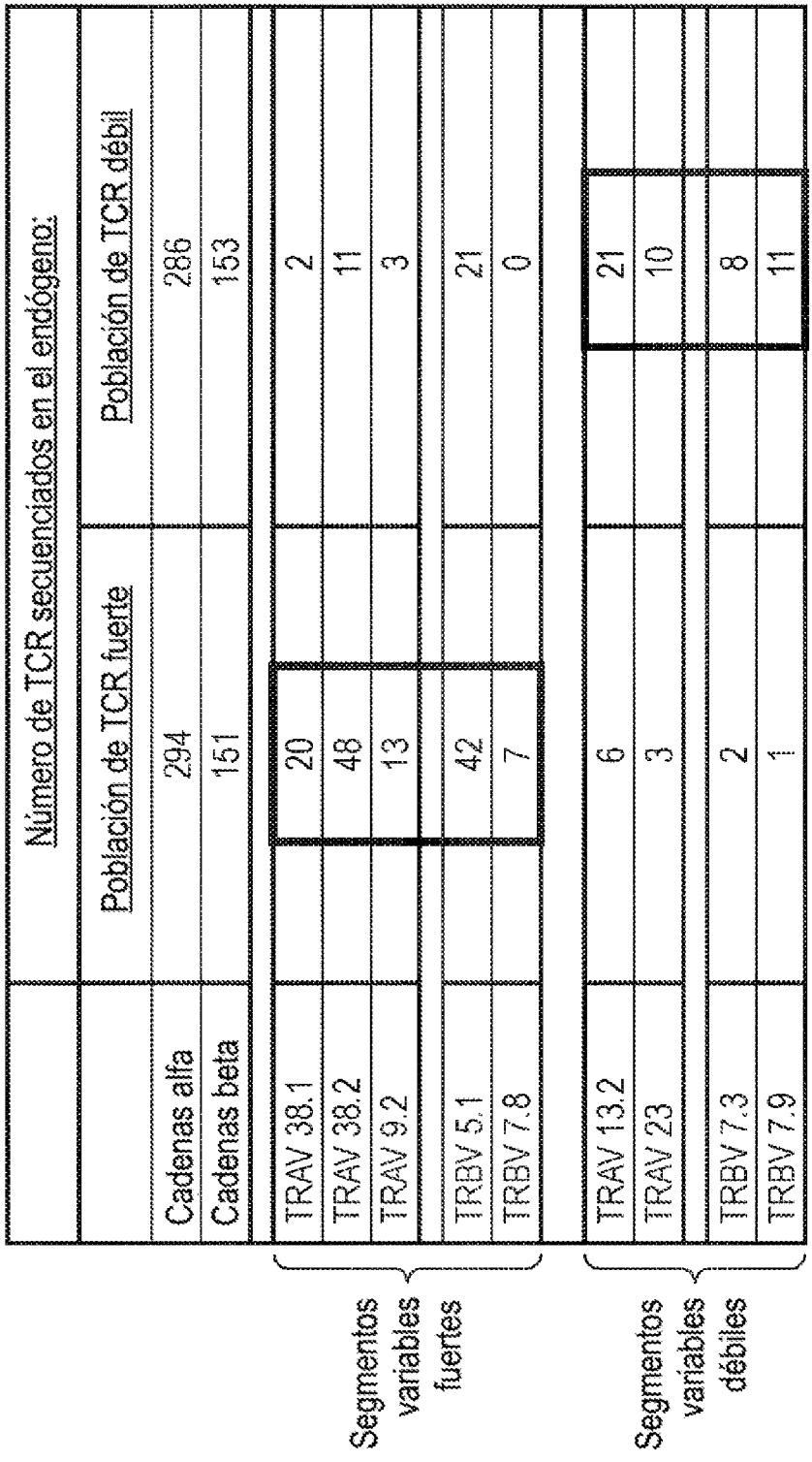

Número de TCR secuenciados en el endógeno:
Población de TCR fuerte
Población de TCR débil
Cadenas alfa
294
286
Cadenas beta
151
153
Segmentos variables fuertes
TRAV 38.1
20
2
TRAV 38.2
48
11
TRAV 9.2
13
3
TRBV 5.1
42
21
TRBV 7.8
7
0
Segmentos variables débiles
TRAV 13.2
6
21
TRAV 23
3
10
TRBV 7.3
2
8
TRBV 7.9
1
11

FIG. 3

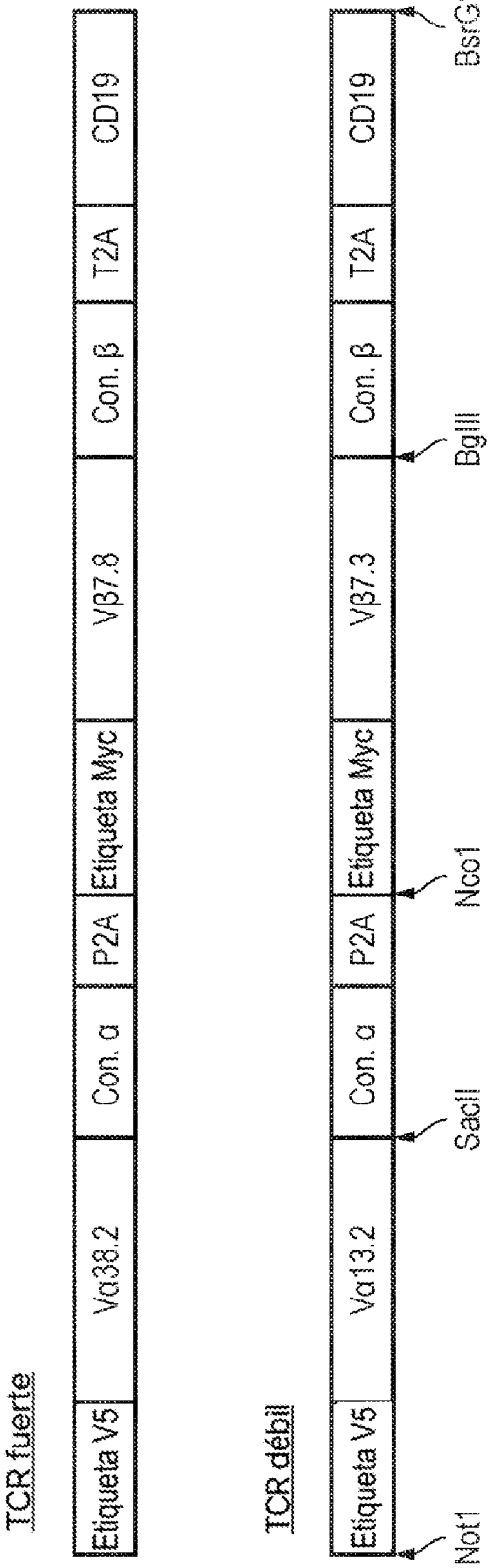
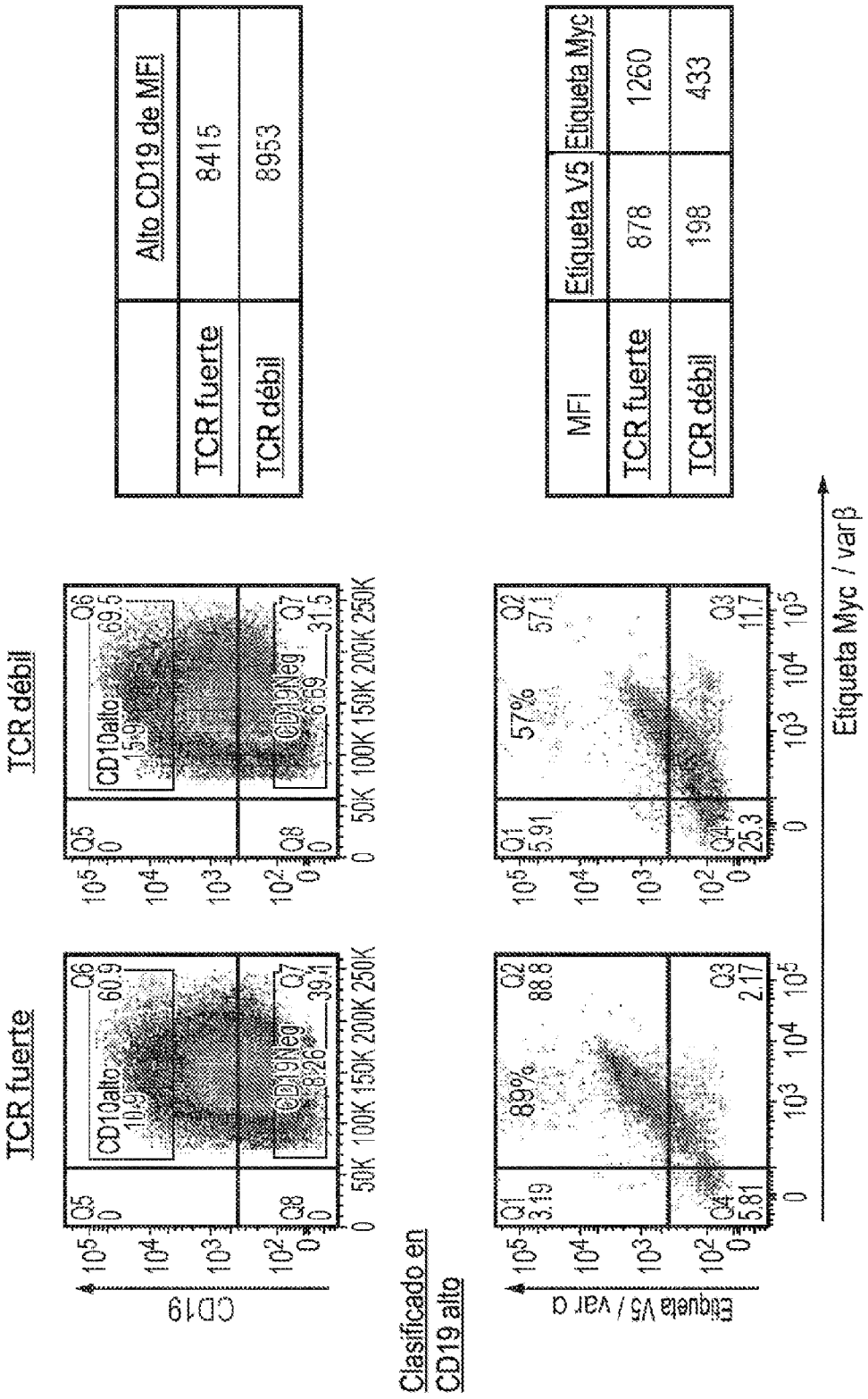

TCR fuerte
Etiqueta V5
Vα38.2
Con. α
P2A
Etiqueta Myc
Vβ7.8
Con. β
T2A
CD19
TCR débil
Etiqueta V5
Vα13.2
Con. α
P2A
Etiqueta Myc
Vβ7.3
Con. β
T2A
CD19
Not1
SacII
Nco1
BglII
BsrG1

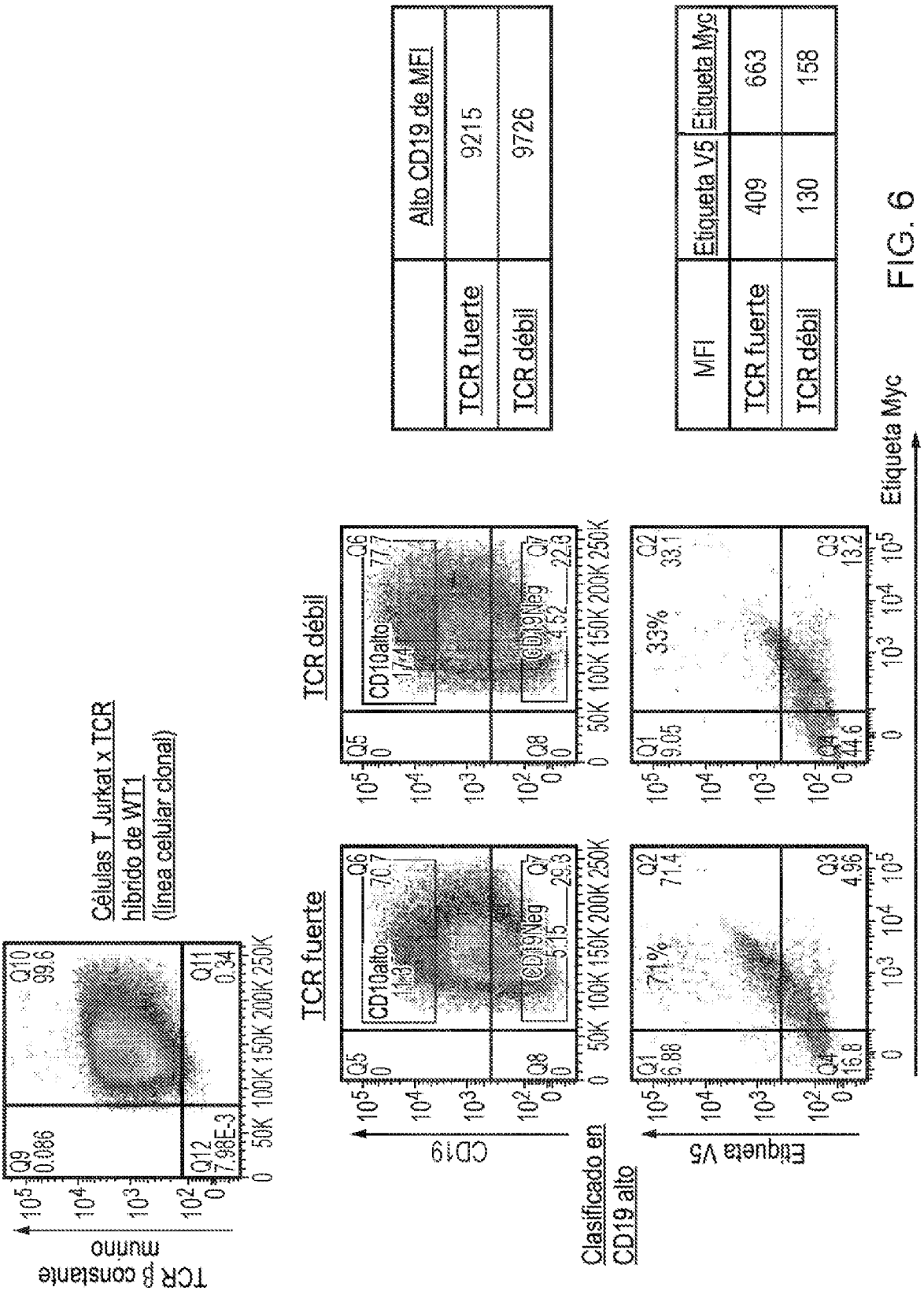
FIG. 4



	Alto CD19 de MFI
TCR fuerte	8415
TCR débil	8953

MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	878	1260
TCR débil	198	433

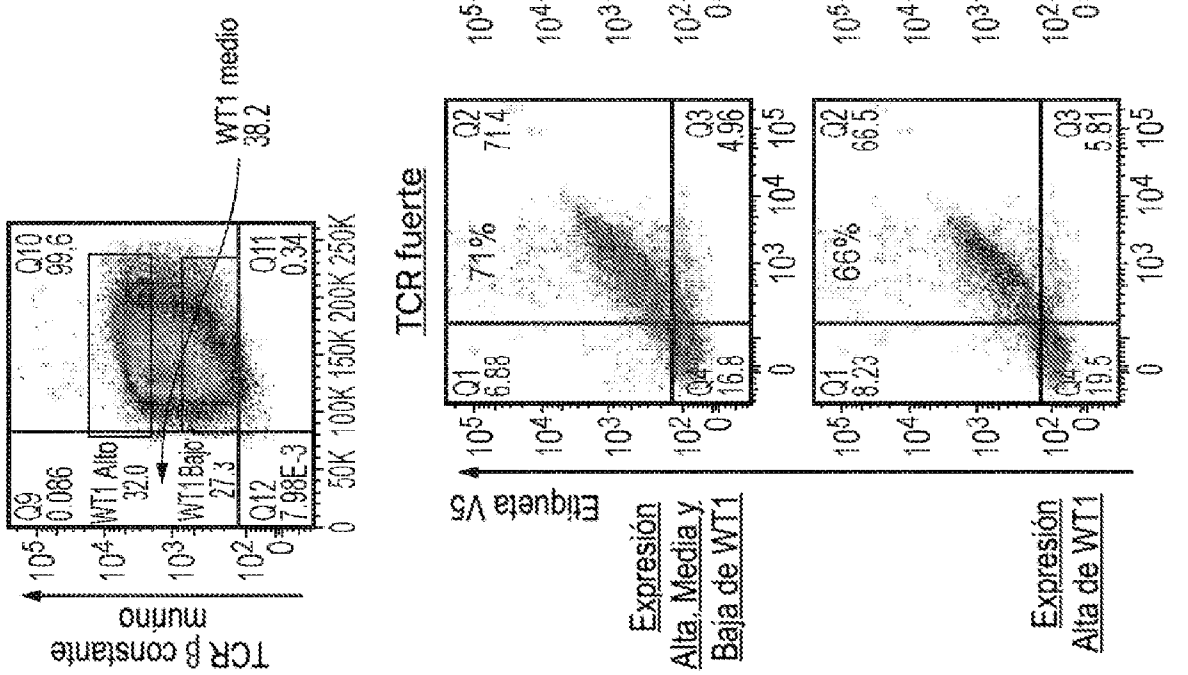
FIG. 5



	Alto CD19 de MFI
TCR fuerte	9215
TCR débil	9726

MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	409	663
TCR débil	130	158

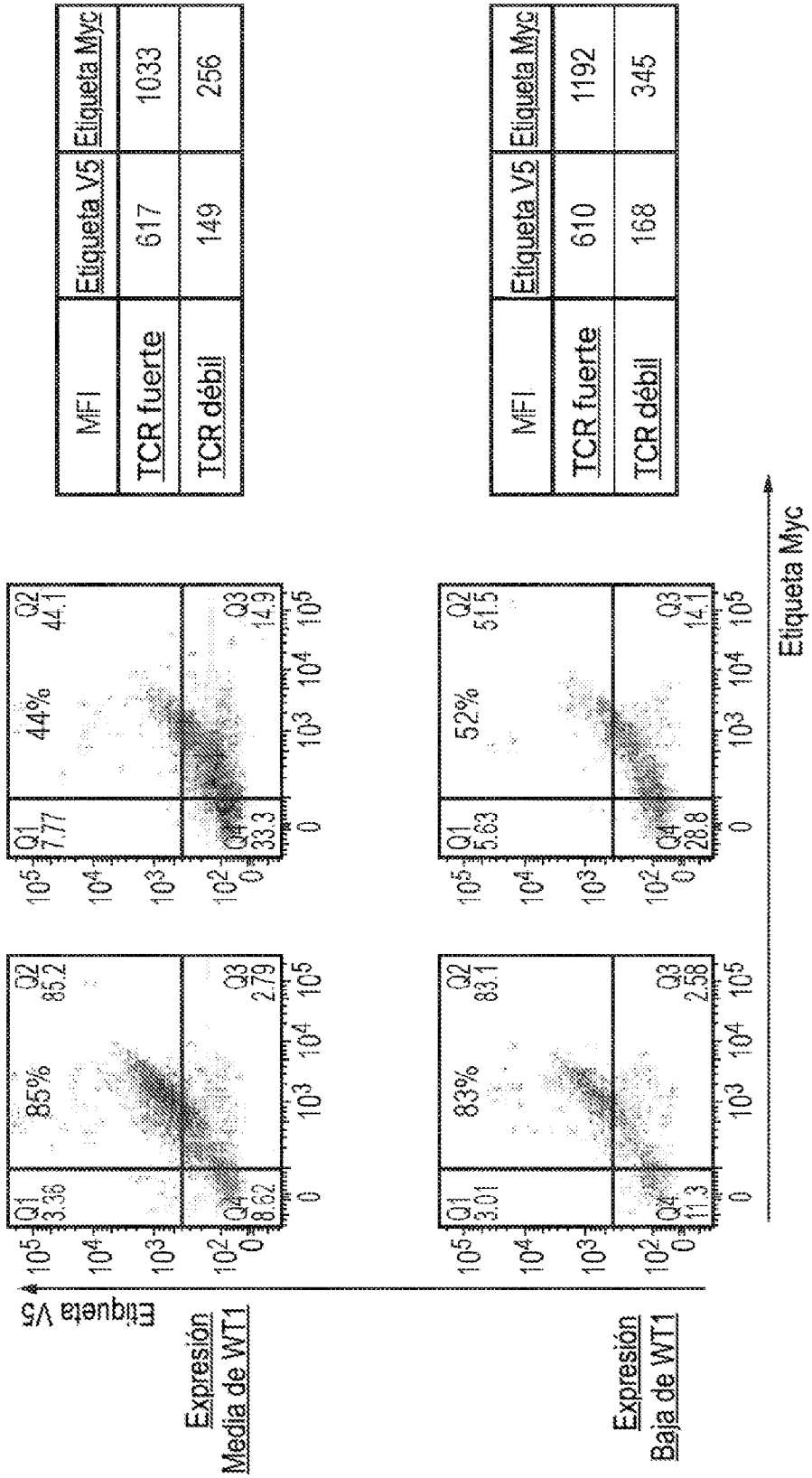
FIG. 6



MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	409	663
TCR débil	130	158

MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	324	491
TCR débil	123	131

FIG. 7



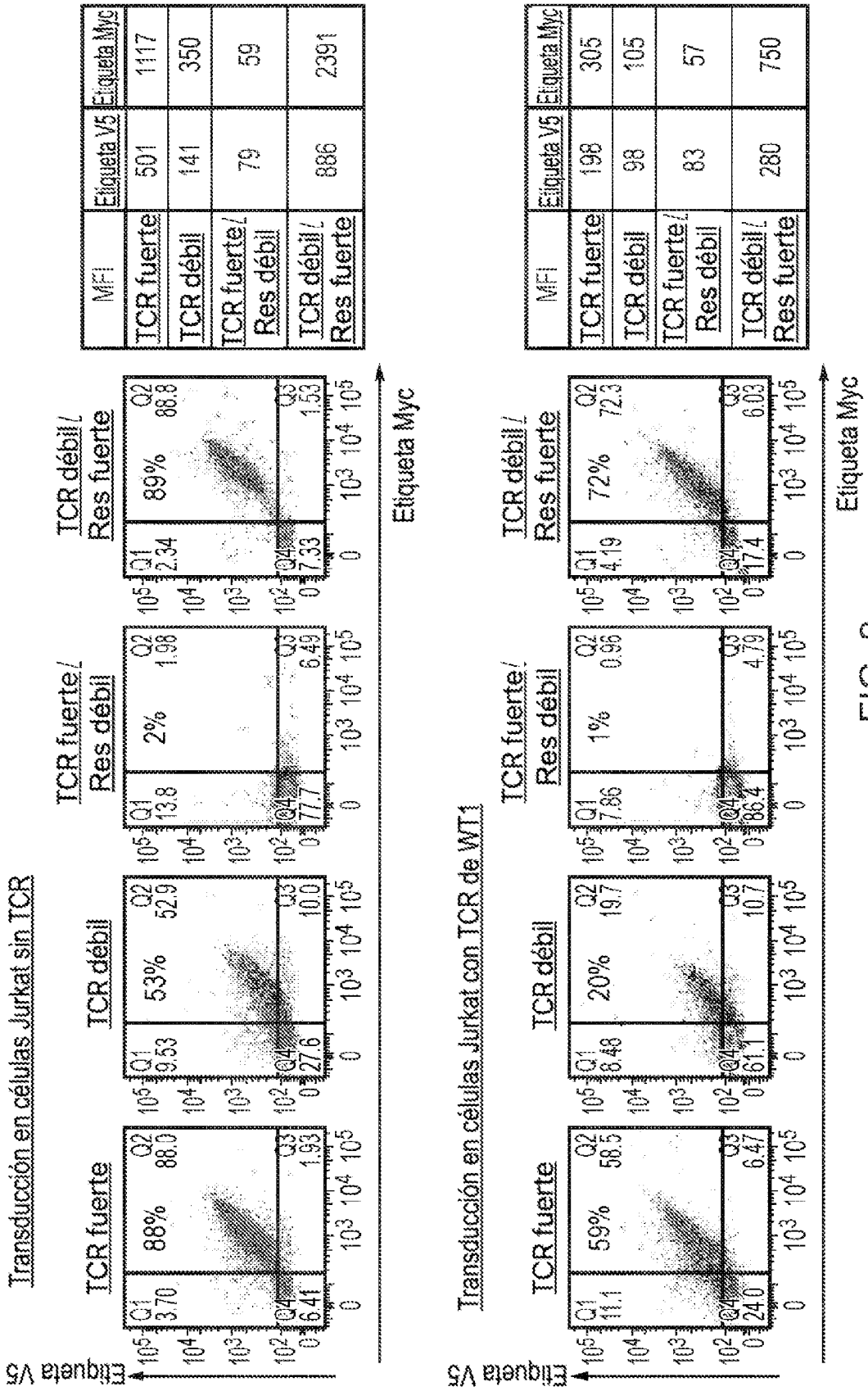
MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	617	1033
TCR débil	149	256

MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	610	1192
TCR débil	168	345

FIG. 7 (Continuación)

A)
Gen TRAV
FR1-IMGT (1-26)
CDR1-IMGT (27-38)
FR2-IMGT (39-55)
CDR2-IMGT (56-65)
FR3-IMGT (66-104)
CDR3-IMGT (105-115)
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
TRAV38-1 AQIVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYD TSENNYY LFWYKQPPSRQMILVIR QEAYKQQ NATEN RFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFC AFMK
B)
Segmentos alfa variables fuertes
FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3
AQIVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYD TSEN NYY LFWYKQPPSRQMILVIR QEAY KQQN ATE NRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFC AFMK
T Q VT T L M R A S L
ICR débil G L SI A F P D R H P
Segmentos beta variables fuertes
FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3
GACVSQSPRYKVAKRGQDVALRCDPI SGH VS LFWYQQALGQGPEFLTY FQN EAQ LDKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRTQQEDSAVYLC ASSL
RY V L Q L
ICR débil SN V L R L

FIG. 8



MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	501	1117
TCR débil	141	350
TCR fuerte / Res débil	79	59
TCR débil / Res fuerte	886	2391

MFI	Etiqueta V5	Etiqueta Myc
TCR fuerte	198	305
TCR débil	98	105
TCR fuerte / Res débil	83	57
TCR débil / Res fuerte	280	750

FIG. 9

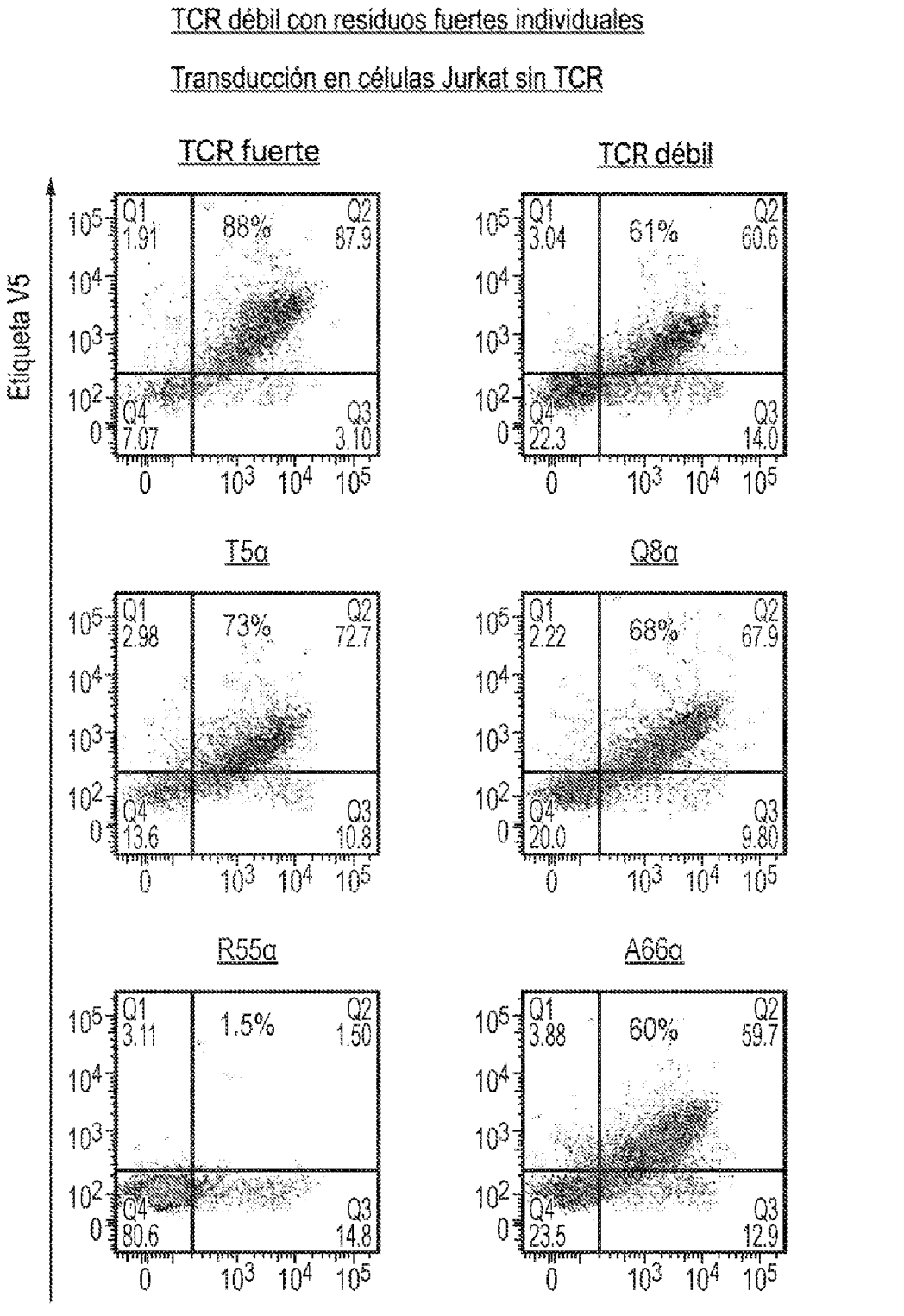

TCR débil con residuos fuertes individuales
Transducción en células Jurkat sin TCR
TCR fuerte
TCR débil
Etiqueta V5
Q1 1.91
88%
Q2 87.9
Q4 7.07
Q3 3.10
Q1 3.04
61%
Q2 60.6
Q4 22.3
Q3 14.0
T5α
Q8α
Q1 2.98
73%
Q2 72.7
Q4 13.6
Q3 10.8
Q1 2.22
68%
Q2 67.9
Q4 20.0
Q3 9.80
R55α
A66α
Q1 3.11
1.5%
Q2 1.50
Q4 80.6
Q3 14.8
Q1 3.88
60%
Q2 59.7
Q4 23.5
Q3 12.9
0
10^3
10^4
10^5
10^2

FIG. 10

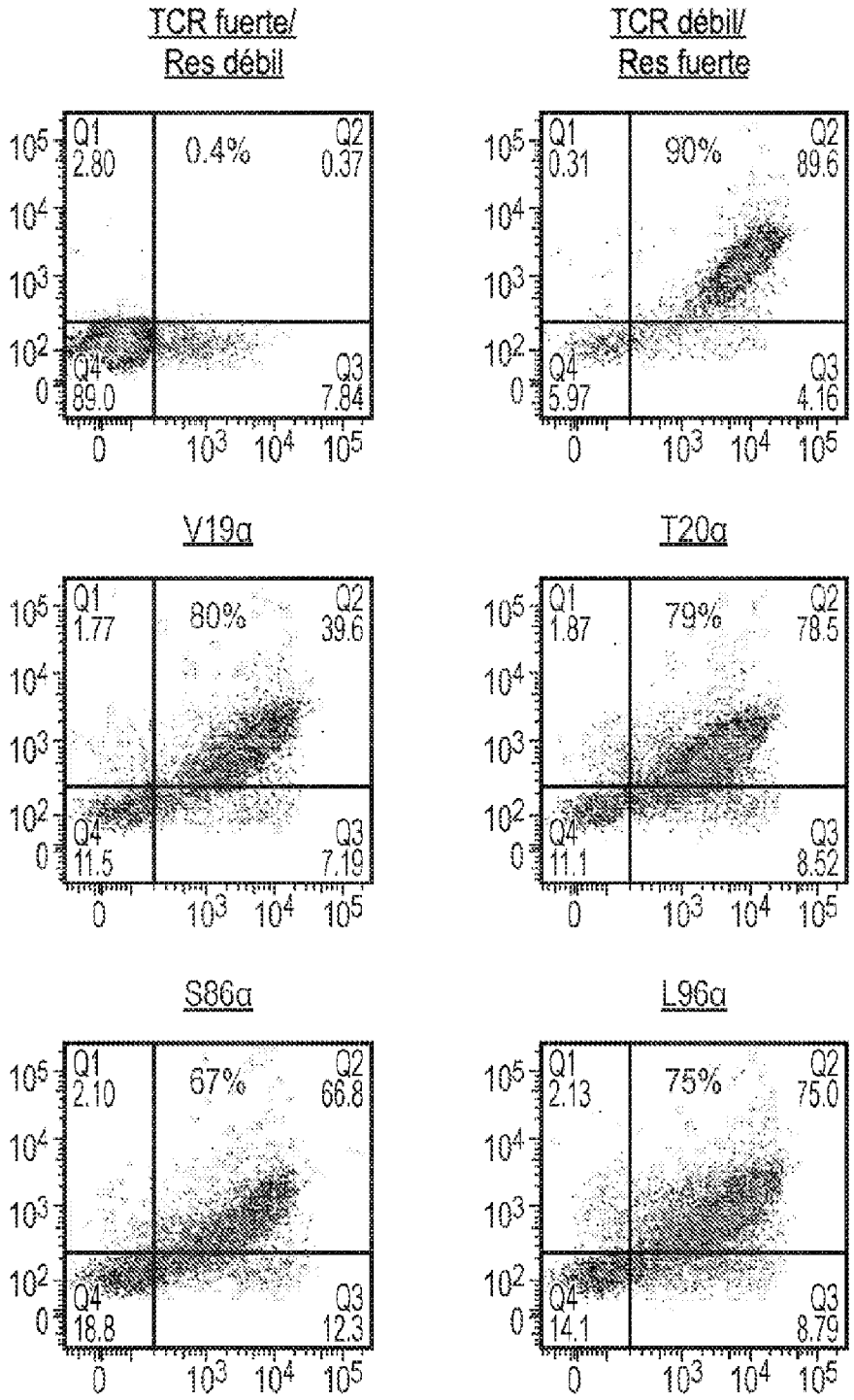


FIG. 10 (Continuación)

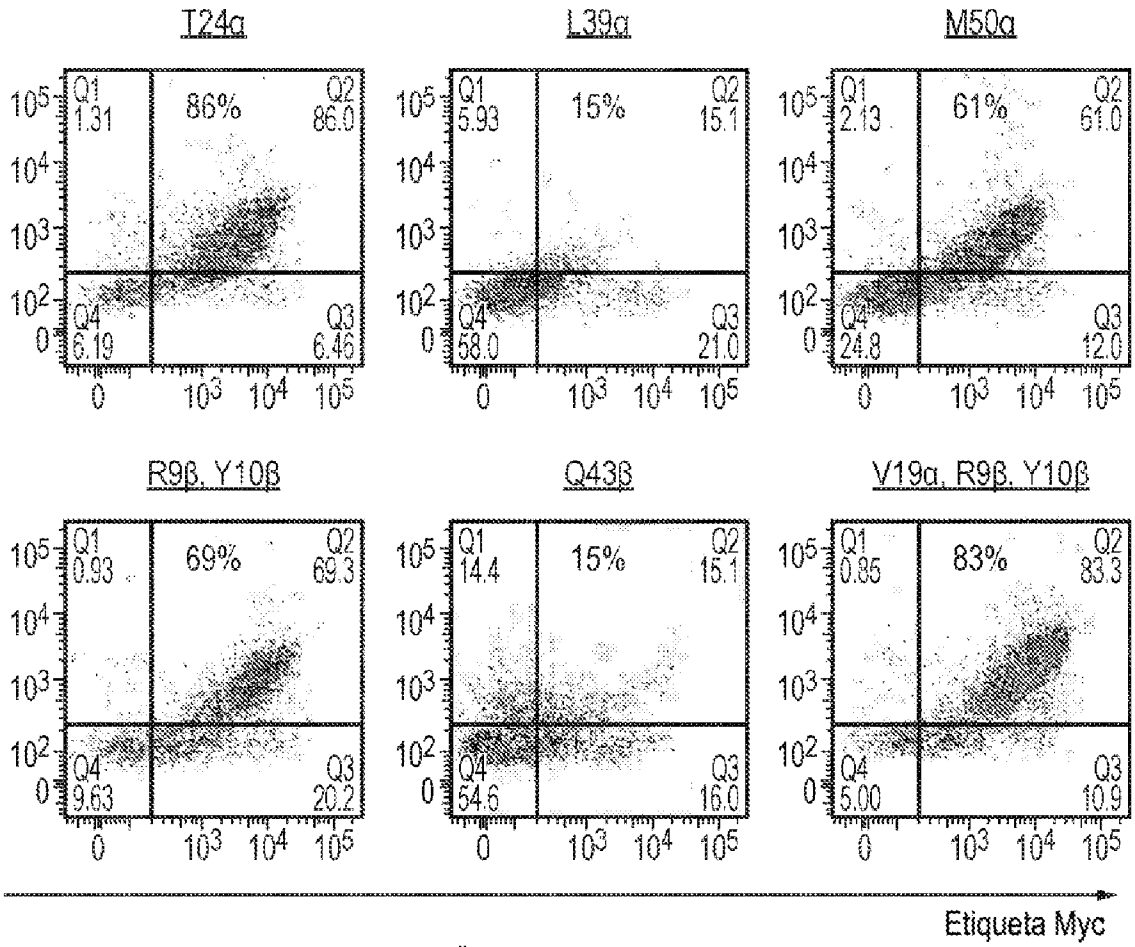


FIG. 10 (Continuación)

	Células Jurkat		
TCR	%	Myc MFI	V5 MFI
TCR fuerte	88	2840	1341
TCR débil	61	1077	377
TCR fuerte/Res débil	0.4	62	138
TCR débil/Res fuerte	90	8582	1617
T5α	73	1529	479
Q8α	68	1699	527
V19α	80	3587	791
T20α	79	2340	562
T24α	86	2937	661
L39α	15	135	170
M50α	61	1159	378
R55α	1.5	89	141
A66α	60	826	366
S86α	67	1854	465
L96α	75	3738	770
R9β, Y10β	69	3951	599
Q43β	15	117	185
V19α, R9β, Y10β	83	6717	1064

FIG. 10 (Continuación)

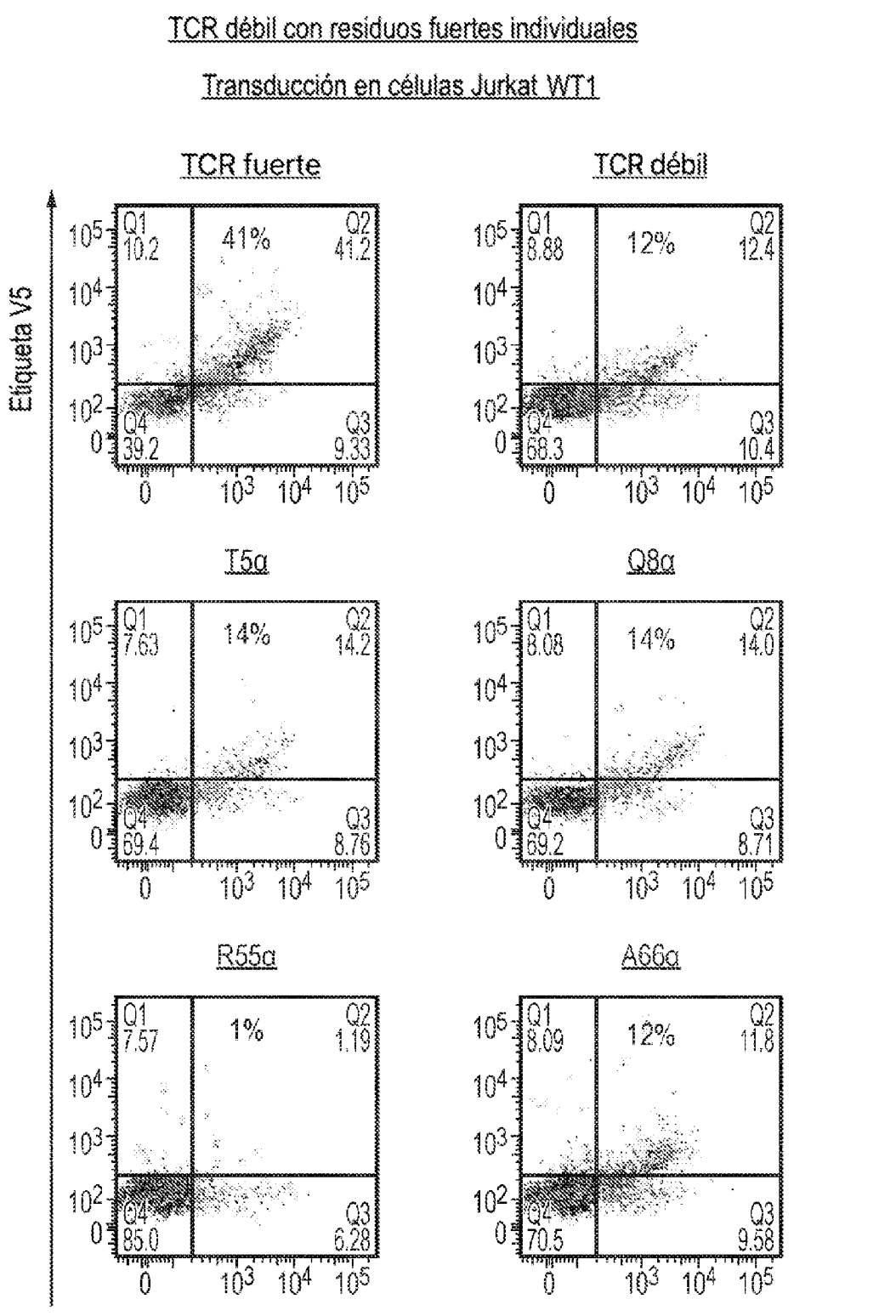

TCR débil con residuos fuertes individuales
Transducción en células Jurkat WT1
TCR fuerte
TCR débil
Etiqueta V5
Q1 10.2
41%
Q2 41.2
Q4 39.2
Q3 9.33
Q1 8.88
12%
Q2 12.4
Q4 68.3
Q3 10.4
T5α
Q8α
Q1 7.63
14%
Q2 14.2
Q4 69.4
Q3 8.76
Q1 8.08
14%
Q2 14.0
Q4 69.2
Q3 8.71
R55α
A66α
Q1 7.57
1%
Q2 1.19
Q4 85.0
Q3 6.28
Q1 8.09
12%
Q2 11.8
Q4 70.5
Q3 9.58
0
10^3
10^4
10^5
10^2

FIG. 11

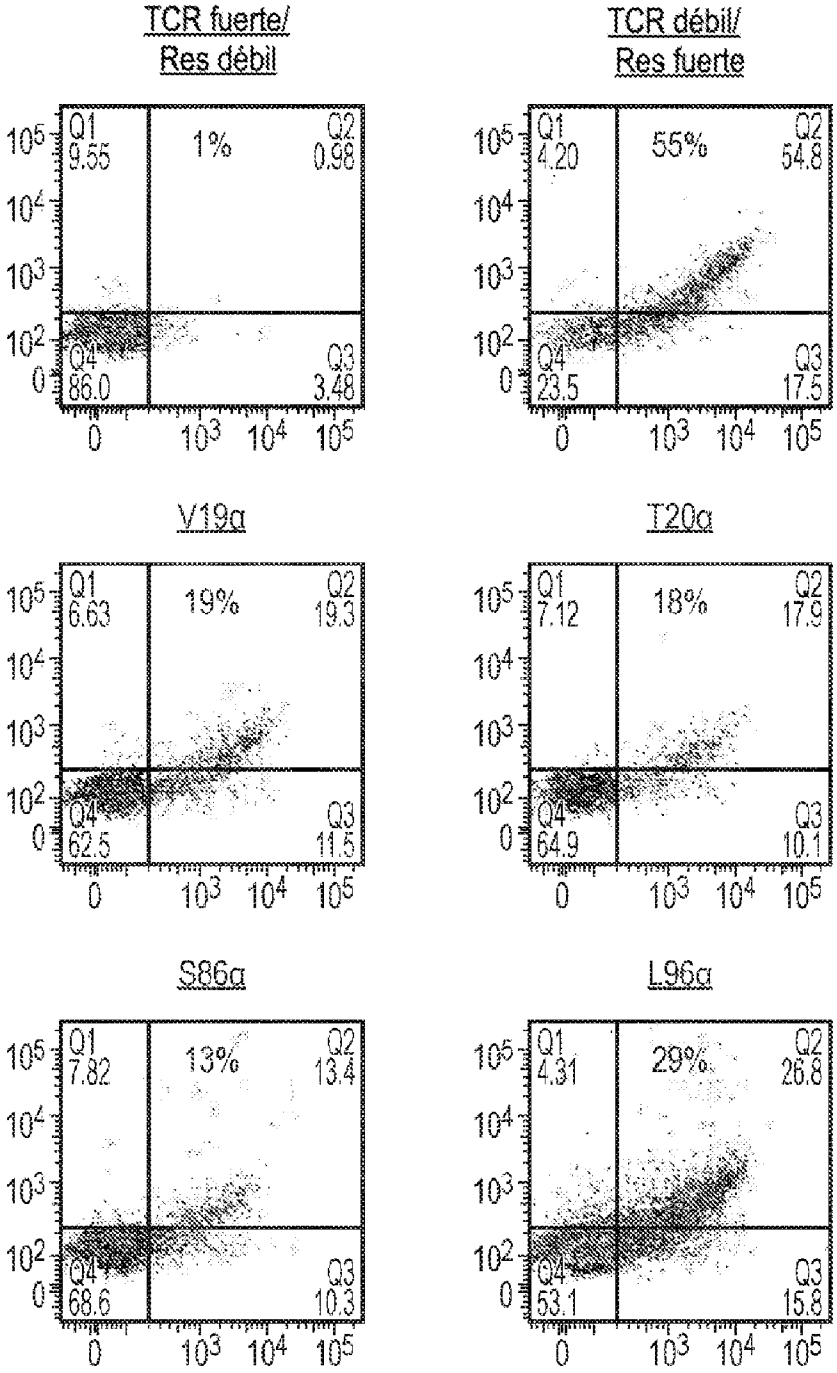


FIG. 11 (Continuación)

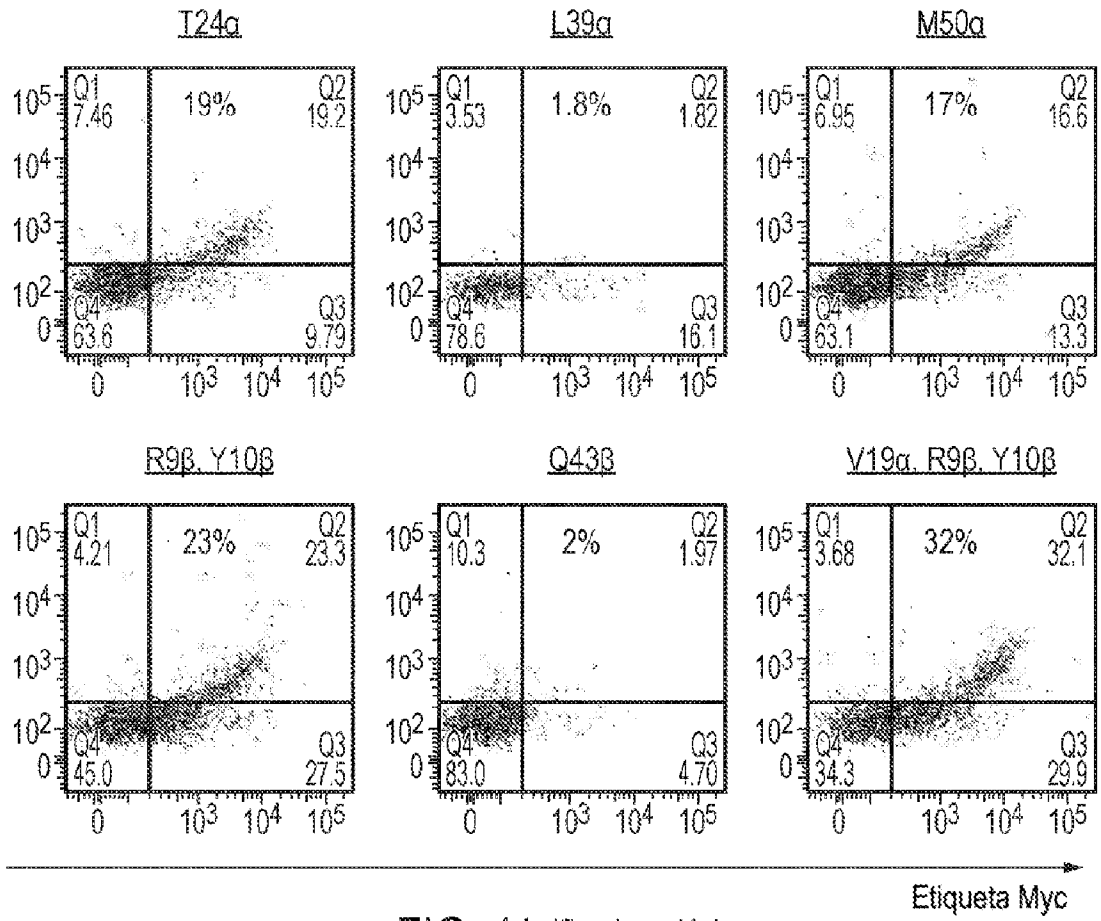


FIG. 11 (Continuación)

	Células Jurkat con TCR de WT1		
TCR	%	Myc MFI	V5 MFI
TCR fuerte	41	217	224
TCR débil	12	100	163
TCR fuerte/Res débil	1	62	149
TCR débil/Res fuerte	55	704	254
T5α	14	91	159
Q8α	14	96	163
V19α	19	121	164
T20α	18	109	167
T24α	19	114	168
L39α	1.8	82	145
M50α	17	114	164
R55α	1	64	141
A66α	12	96	154
S86α	13	101	156
L96α	29	162	180
R9β, Y10β	23	219	164
Q43β	2	65	149
V19α, R9β, Y10β	32	344	184

FIG. 11 (Continuación)

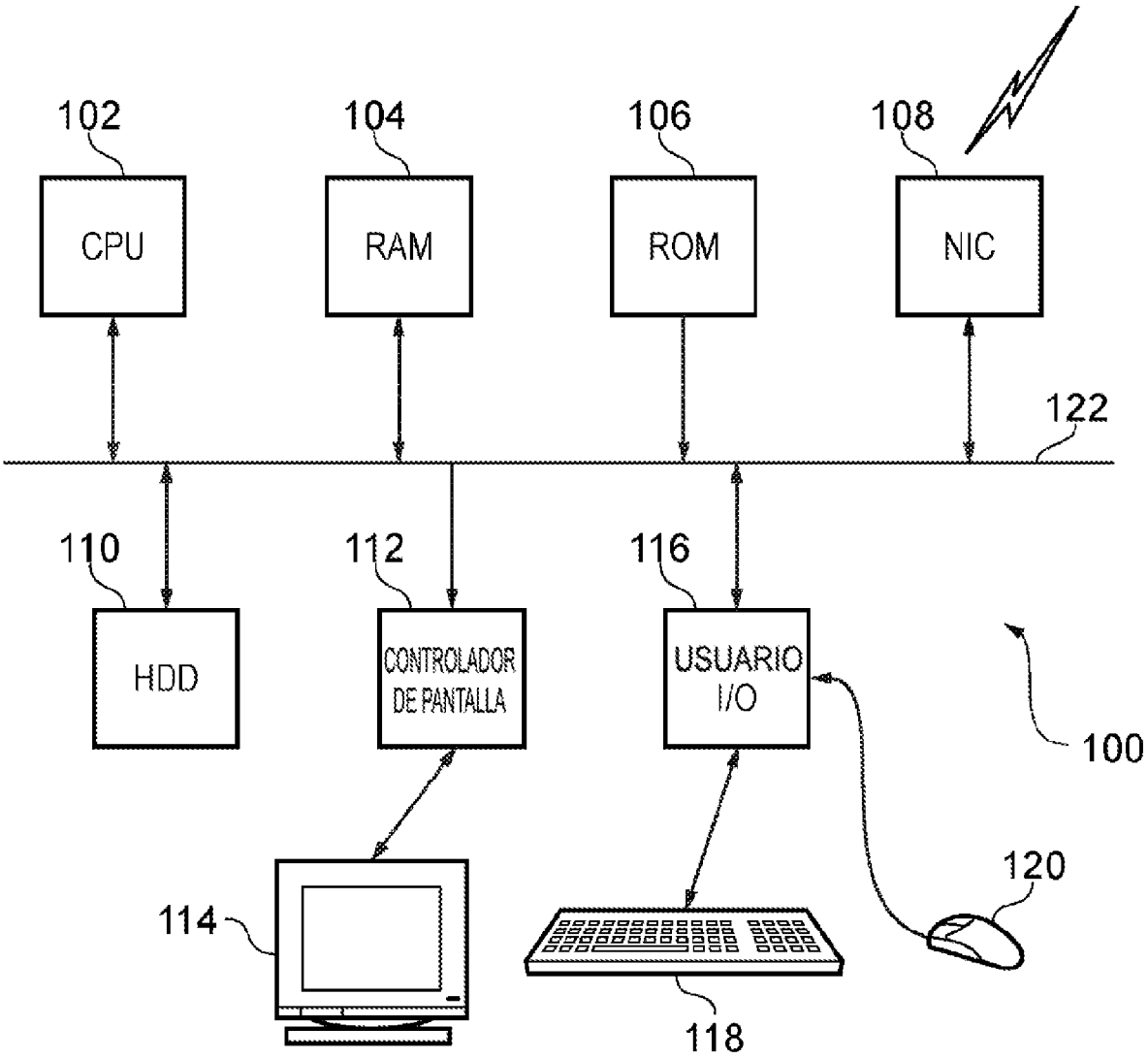
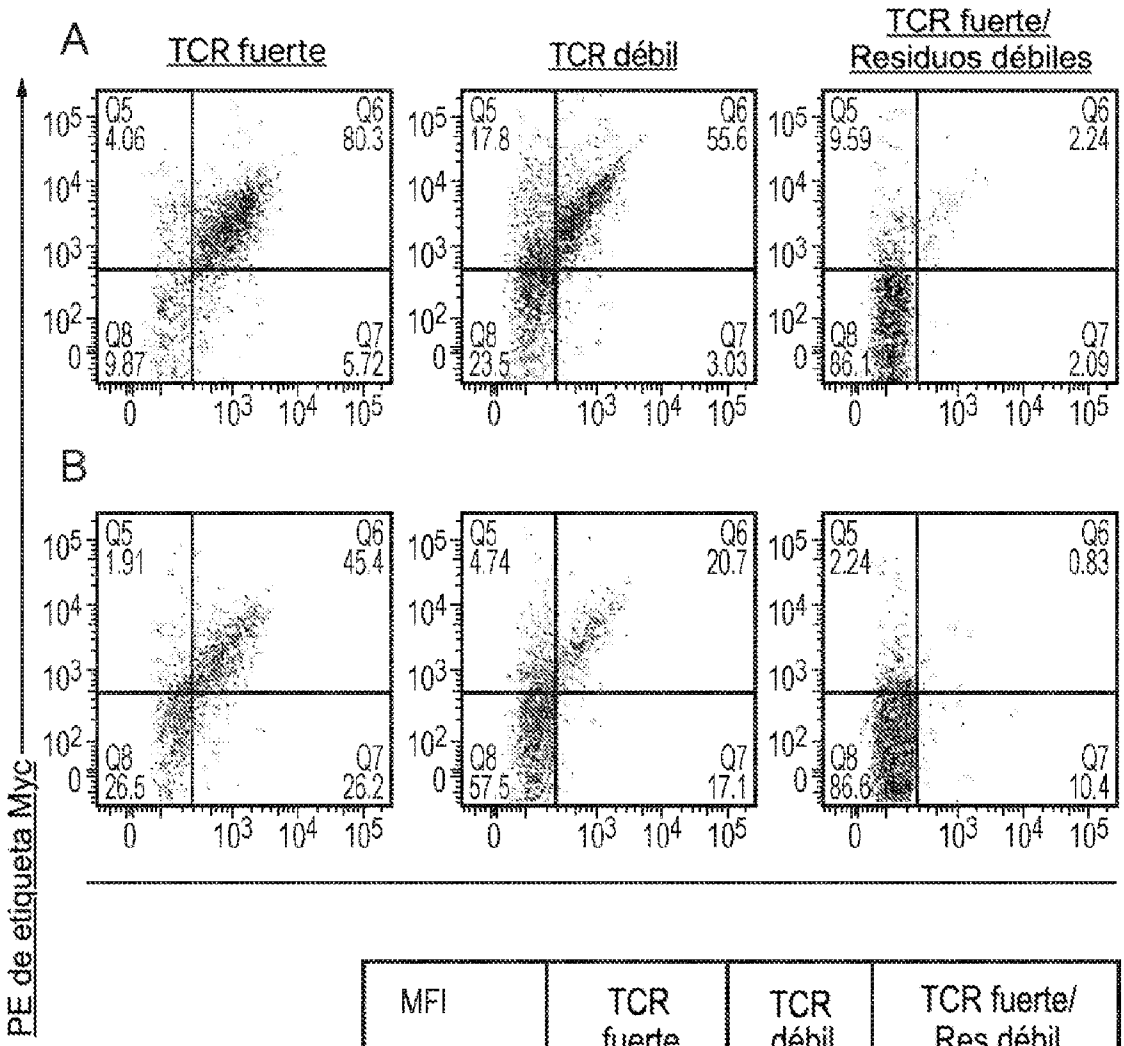

102
104
106
108
CPU
RAM
ROM
NIC
122
110
112
116
HDD
CONTROLADOR DE PANTALLA
USUARIO I/O
100
120
114
118

FIG. 12



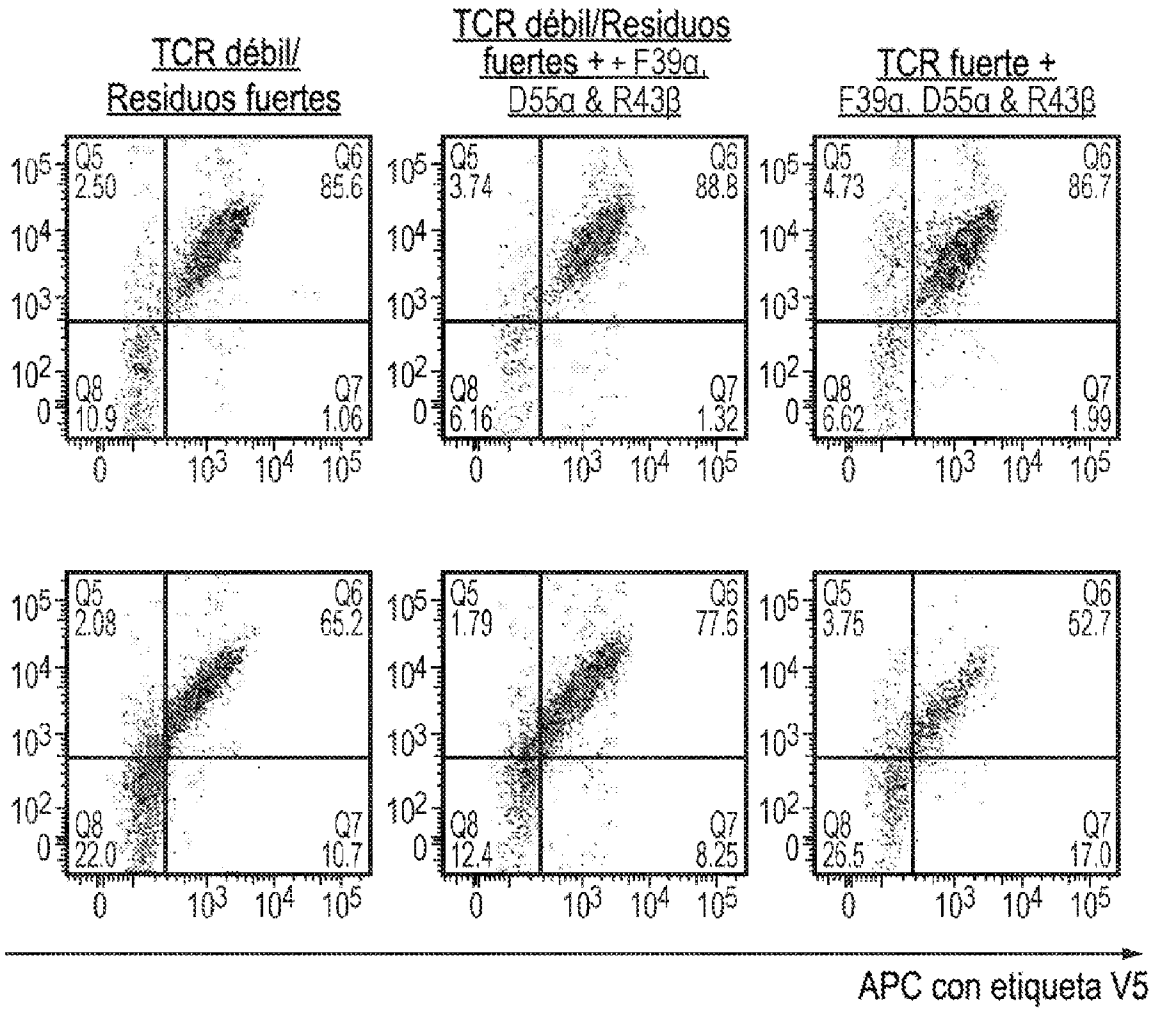
C

MFI	TCR fuerte	TCR débil	TCR fuerte/ Res débil
Etiqueta V5	864	328	149
Etiqueta Myc	2005	1392	114

D

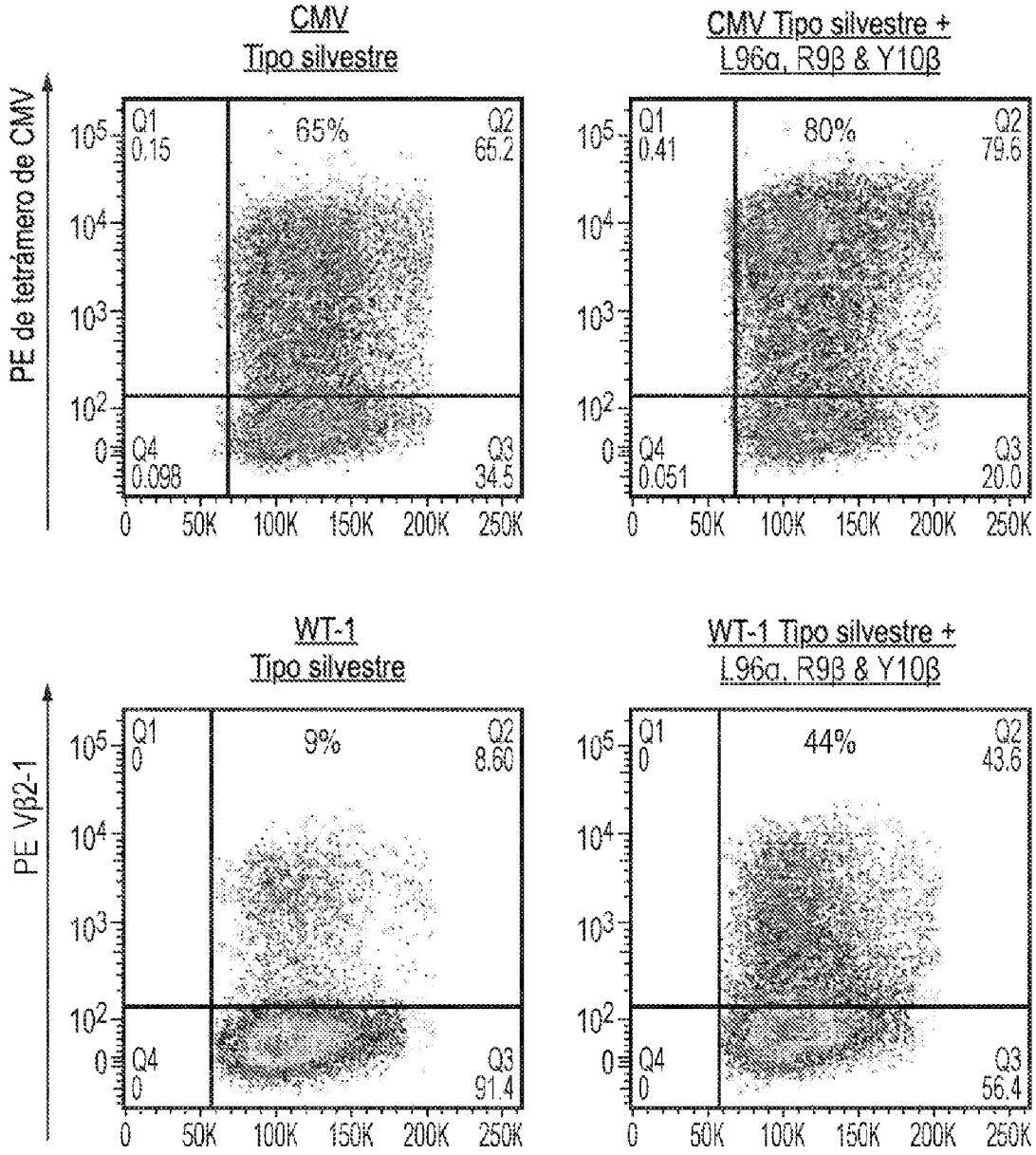
Etiqueta V5	413	209	169
Etiqueta Myc	830	329	132
Con beta	3866	3838	3747

FIG. 13



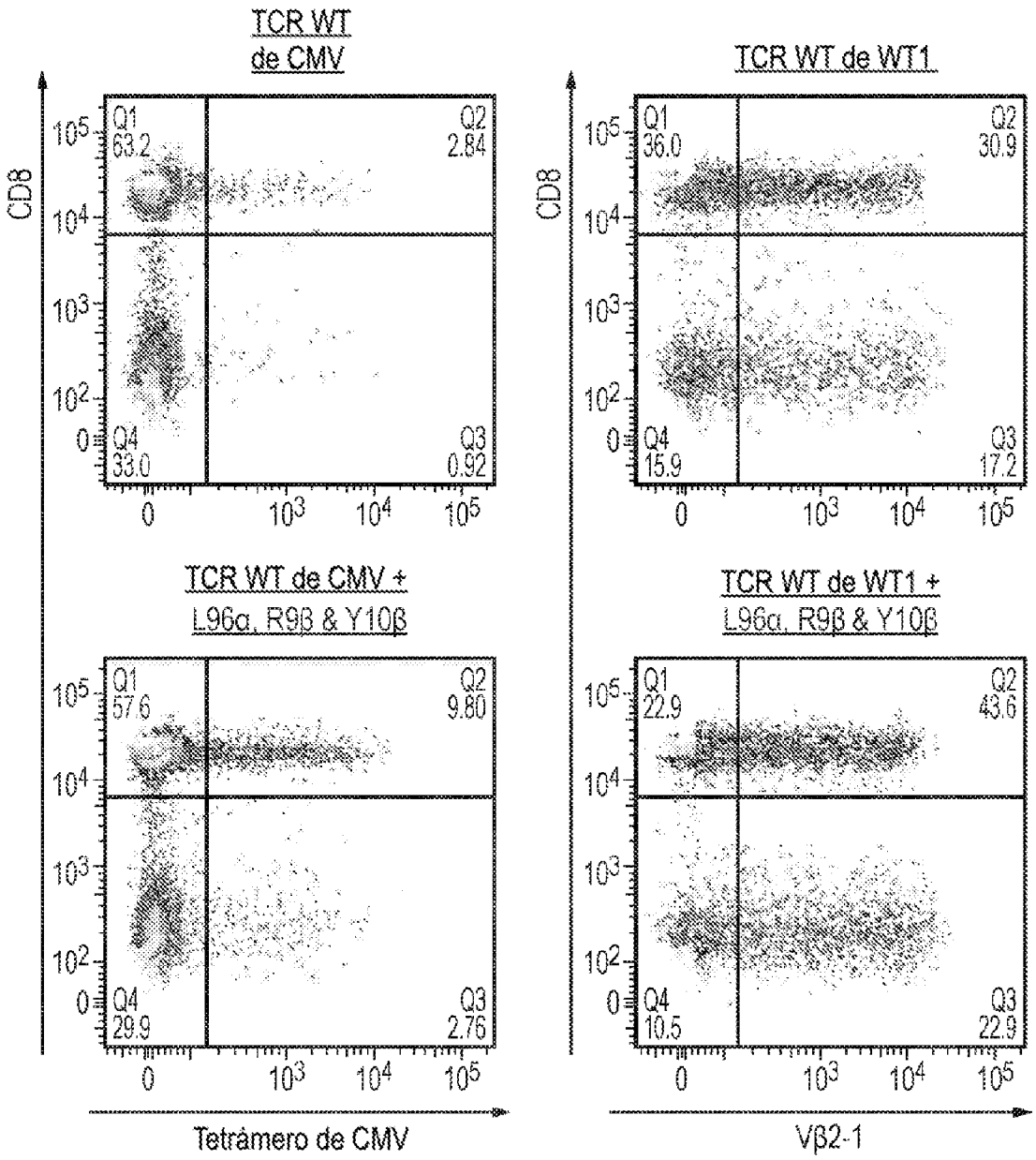
TCR débil / Res fuerte	TCR débil / Res fuerte -3aa	TCR fuerte -3aa
1338	1695	1295
5432	7020	4964
535	868	418
2143	3561	1295
3451	3045	3596

FIG. 13 (Continuación)



MFI	Tipo silvestre	Tipo silvestre + L96α, R9β & Y10β
Tetrámero de CMV	410	2153
Vβ2-1 WT1	64	131

FIG. 14



MFI en Q2	Tipo silvestre	Tipo silvestre + L96α, R9β & Y10β
Tetrámero de CMV	176	341
Vβ2-1 WT1	836	1278

FIG. 15

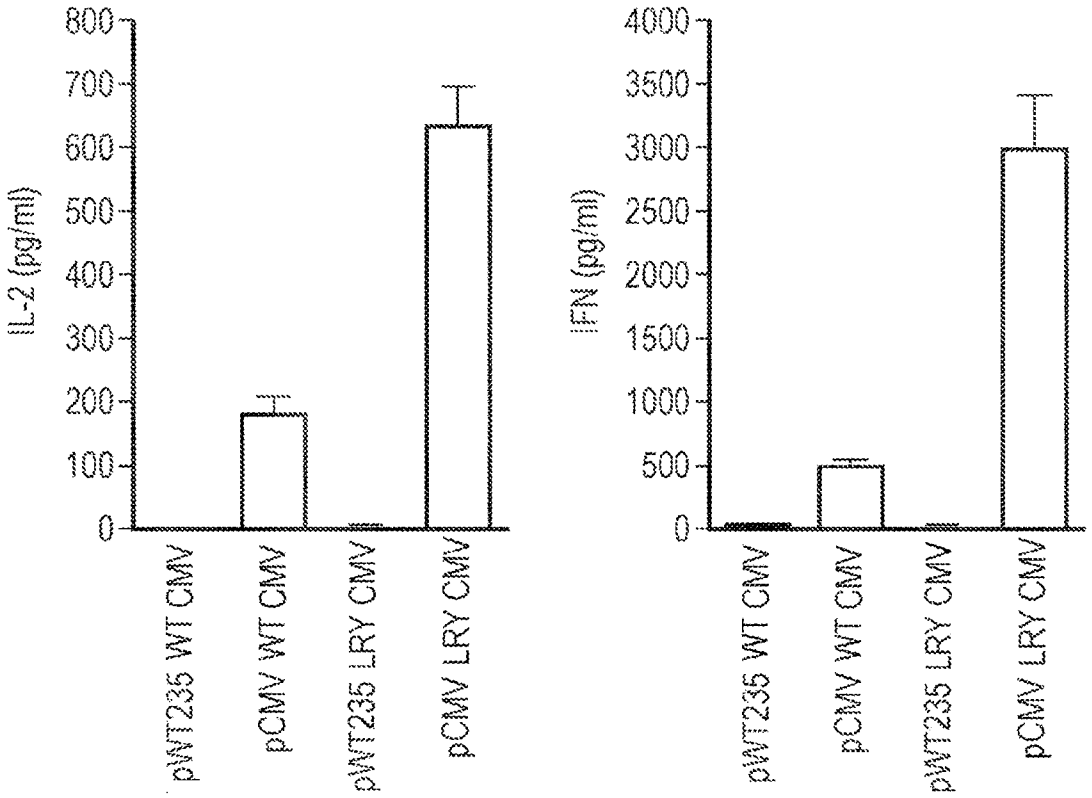

IL-2 (pg/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
pWT235 WT CMV
pCMV WT CMV
pWT235 LRY CMV
pCMV LRY CMV
IFN (pg/ml)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
pWT235 WT CMV
pCMV WT CMV
pWT235 LRY CMV
pCMV LRY CMV

FIG. 16

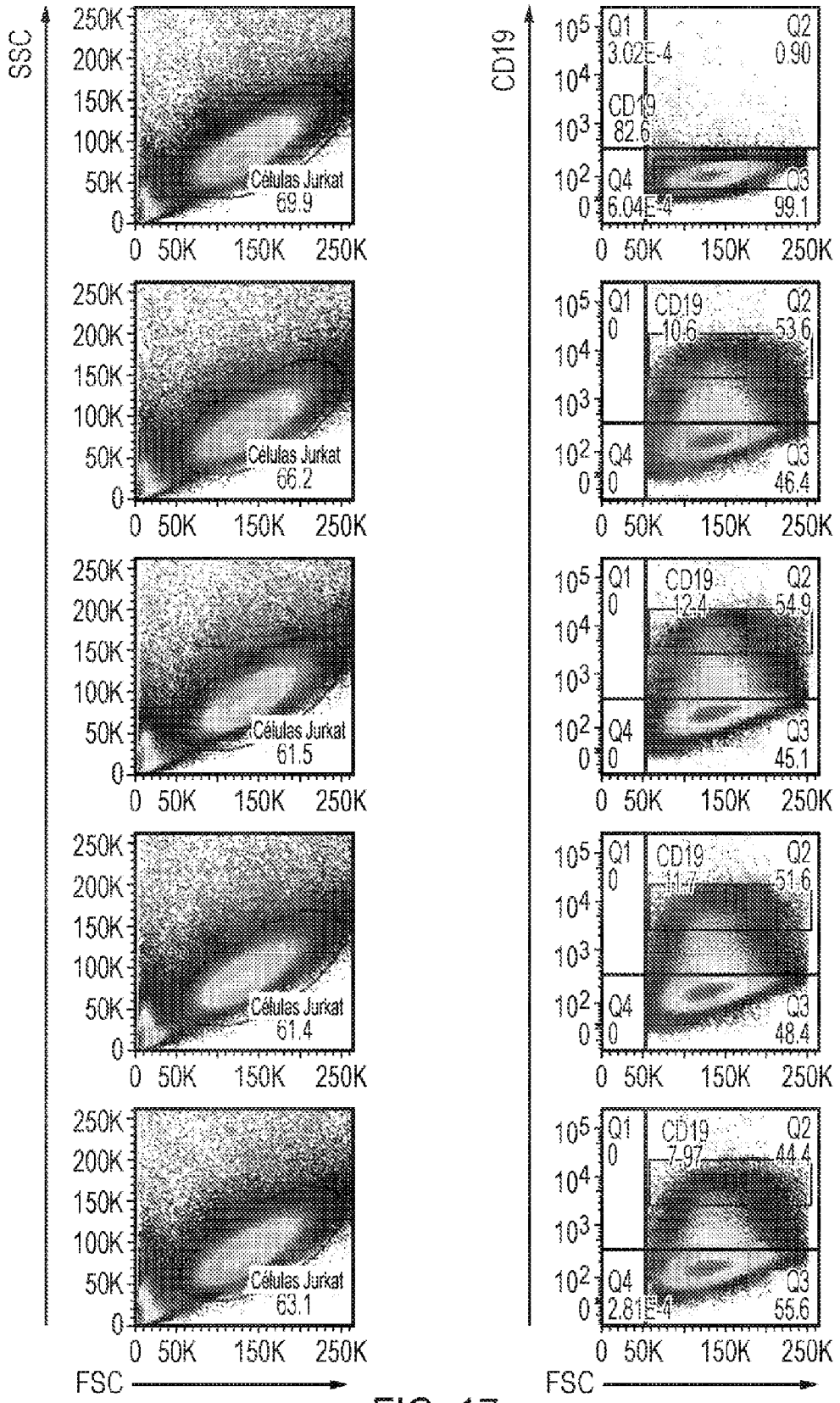

SSC
250K
200K
150K
100K
50K
0
0 50K 150K 250K
Células Jurkat
69.9
66.2
61.5
61.4
63.1
FSC
CD19
10^5
10^4
10^3
10^2
0
Q1
3.02E-4
Q2
0.90
CD19
82.6
Q4
6.04E-4
Q3
99.1
CD19
10.6
53.6
46.4
12.4
54.9
45.1
11.7
51.6
48.4
7.97
44.4
2.81E-4
55.6

FIG. 17

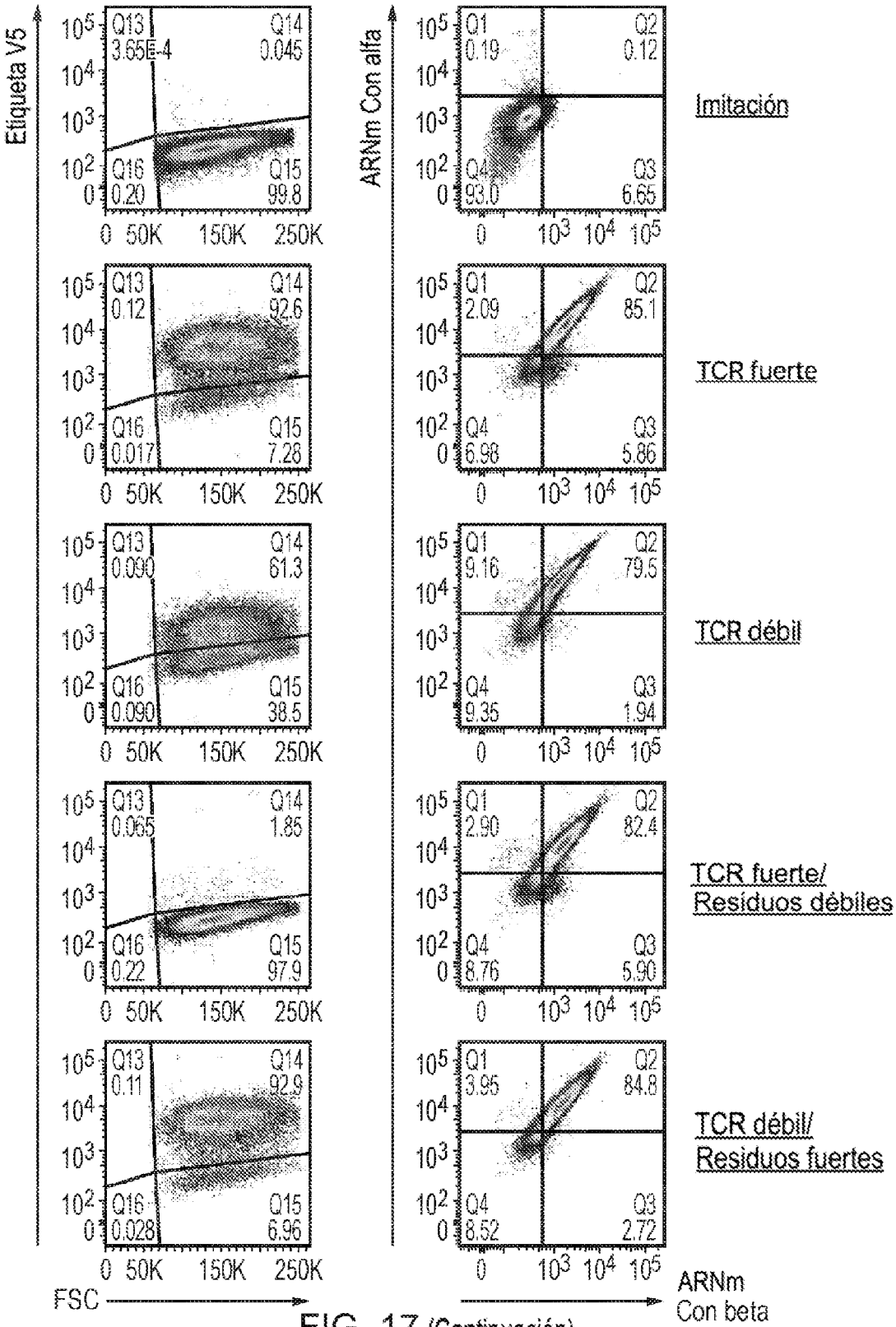


FIG. 17 (Continuación)

Clasificado CD19

MFI	ARNm alfa	ARNm beta
TCR fuerte	9847	1675
TCR débil	8709	1045
TCR fuerte/ Res débil	9035	1480
TCR débil/ Res fuerte	9260	1487

FIG. 17 (Continuación)

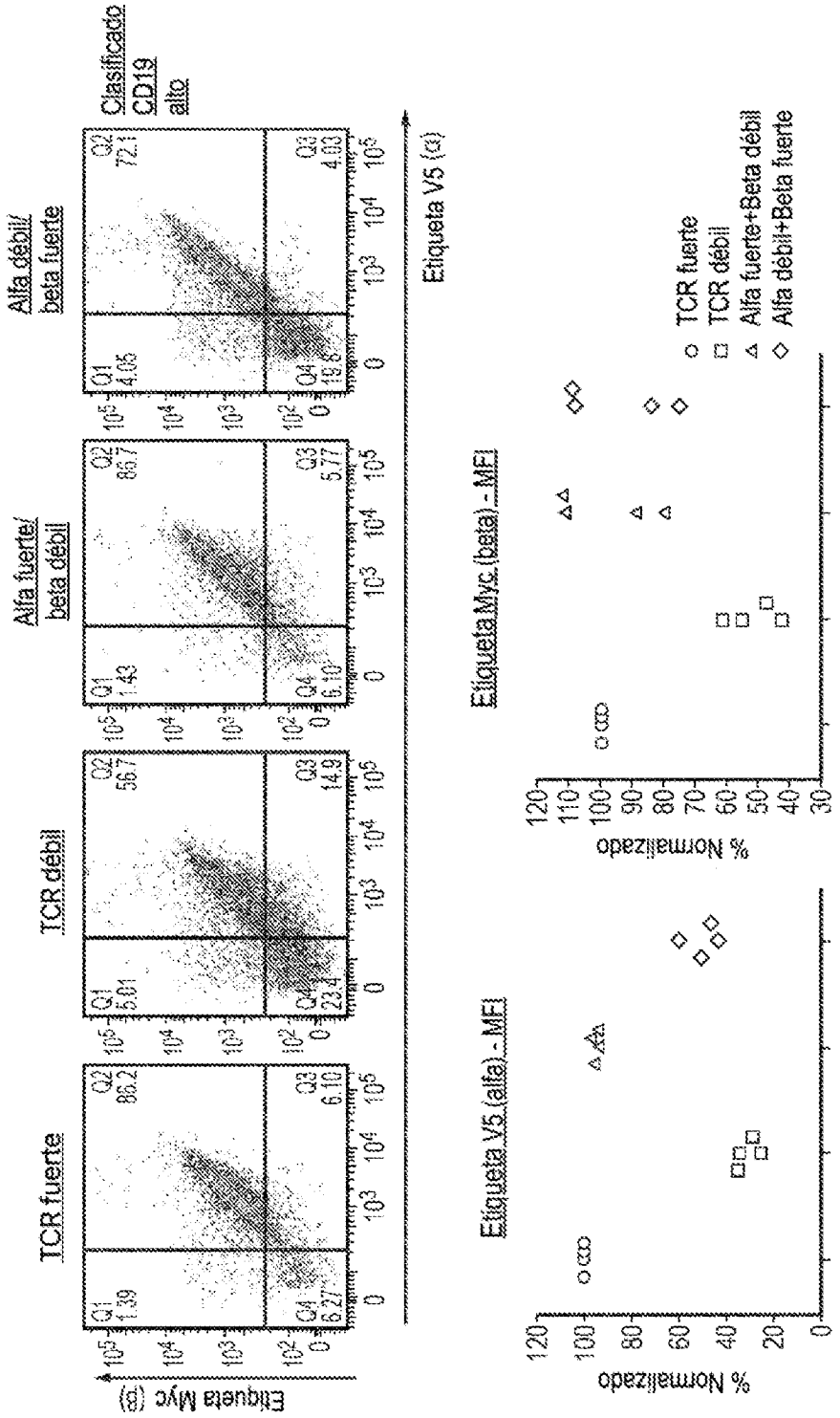

TCR fuerte
TCR débil
Alfa fuerte/ beta débil
Alfa débil/ beta fuerte
Clasificado CD19 alto
Etiqueta Myc (β)
Etiqueta V5 (α)
Q1 1.39
Q2 86.2
Q4 6.27
Q3 6.10
Q1 5.01
Q2 56.7
Q4 22.4
Q3 14.9
Q1 1.43
Q2 86.7
Q4 6.10
Q3 5.77
Q1 4.05
Q2 72.1
Q4 19.8
Q3 4.03
Etiqueta V5 (alfa) - MFI
% Normalizado
Etiqueta Myc (beta) - MFI
% Normalizado
TCR fuerte
TCR débil
Alfa fuerte+Beta débil
Alfa débil+Beta fuerte

FIG. 18