

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 766**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2017 PCT/CN2017/113631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2018 WO18099402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2017 E 17875487 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3549954**

54 Título: **TCR de alta afinidad para NY-ESO**

30 Prioridad:

29.11.2016 CN 201611078596

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

07.11.2024

73 Titular/es:

**XLIFESC, LTD. (100.0%)
Office 2715, No. 3000, Huandao East
RoadHengqin New District
Zhuhai, Guangdong 519031, CN**

72 Inventor/es:

**LI, YI y
HUANG, JINHUA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 985 766 T3

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

DESCRIPCIÓN

TCR de alta afinidad para NY-ESO

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y, en particular, a un receptor de linfocitos T (TCR) capaz de reconocer un polipéptido derivado de la proteína NY-ESO-1. La invención también se refiere a la preparación y a usos de dichos receptores.

10

Antecedentes

Sólo hay dos tipos de moléculas que pueden reconocer antígenos de una manera específica. Uno es la inmunoglobulina o anticuerpo y el otro es el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés), que es una glicoproteína heterodimérica α/β o γ/δ en la membrana celular. El repertorio físico de TCR del sistema inmunitario se genera en el timo a través de la recombinación V (D) J, seguida de selecciones positivas y negativas. En el entorno periférico, los TCR median el reconocimiento de complejos Complejo mayor de histocompatibilidad-péptido (pMHC, por sus siglas en inglés) específicos por parte de los linfocitos T y, de este modo, son esenciales para el funcionamiento inmunitario de las células del sistema inmunitario.

15

20

TCR es el único receptor que presenta antígenos peptídicos específicos en el Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Los péptidos exógenos o endógenos pueden ser el único signo de anomalía en una célula. En el sistema inmunitario, una vez que los TCR específicos de antígeno se unen a los complejos pMHC, provocan contacto físico directo entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). Después, se produce la interacción de otras moléculas de membrana en el linfocito T y APC, y se inician la señalización celular posterior y otras respuestas fisiológicas de manera que una gama de linfocitos T específicos de antígenos diferentes ejercen efectos inmunitarios sobre sus células diana.

25

30

Los ligandos moleculares del MHC de clase I y II correspondientes al TCR también son proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, pero son específicos para la presentación de antígenos, y diferentes individuos tienen diferentes MHC, presentando de este modo diferentes péptidos cortos en un antígeno proteico a la superficie de las respectivas células APC. El MHC humano se conoce habitualmente como gen HLA o complejo HLA.

35

El péptido corto SLLMWITQC deriva de la proteína NY-ESO-1 expresada por diversas células tumorales (Chen *et al.*, (1997) *PNAS* EE. UU. 94 1914-1918). Una molécula de HLA de tipo I en células tumorales presenta un péptido corto derivado de NY-ESO-1 que incluye SLLMWITQC. Por lo tanto, el complejo SLLMWITQC-HLA A2 proporciona un marcador para que el TCR se dirija a las células tumorales. El TCR capaz de unirse al complejo SLLMWITQC-HLA A2 tiene un alto valor de aplicación para el tratamiento de tumores. Por ejemplo, un TCR capaz de dirigirse al marcador de células tumorales puede usarse para suministrar un agente citotóxico o agente inmunoestimulador a las células diana, o transformar el mismo en linfocitos T, de manera que el linfocito T que expresa el TCR pueda destruir las células tumorales y pueda administrarse a un paciente durante el curso del tratamiento de la denominada inmunoterapia adoptiva. Para el primer fin, el TCR ideal tiene una mayor afinidad, permitiendo que el TCR resida en las células diana durante un período de tiempo largo. Para este último fin, se prefiere usar un TCR de afinidad media. En consecuencia, un experto en la materia se dirige a desarrollar TCR que puedan usarse para dirigirse a marcadores de células tumorales con diferentes fines.

40

45

Robbins *et al.* (2008, *The Journal of Immunology*, American Association of Immunologists, EE. UU., vol. 180, N.º 9) divulga que las sustituciones de aminoácidos individuales y dobles en las CDR de TCR pueden potenciar las funciones de los linfocitos T específicos de antígenos.

50

Li *et al.* (2005, *Nature Biotechnology*, vol. 23, n.º 3) divulga la evolución dirigida de receptores de linfocitos T humanos con afinidades picomolares mediante presentación en fagos.

55

Dunn *et al.* (2006, *Protein Science*, vol. 15, N.º 4) divulga que la evolución dirigida de restos CDR2 del receptor de linfocitos T humano mediante presentación en fagos potencia la afinidad por el péptido-MHC afin.

El documento WO 2017/076308 A1 divulga un TCR capaz de unirse al oligopéptido SLLMWITQC derivado de antígenos de NY-ESO-1.

60

El documento CN 105 985 427 A divulga un TCR capaz de unirse a SLLMWITQC-HLA A2.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un TCR que tenga una mayor afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2. La invención se define en las reivindicaciones.

65

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método para preparar el TCR del tipo anterior y el uso del TCR del tipo anterior.

5 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un receptor de linfocitos T (TCR), que tiene una actividad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2.

10 El receptor de linfocitos T (TCR) tiene una actividad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2, y el receptor de linfocitos T comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, el dominio variable de cadena TCR α comprende tres regiones CDR, en donde el TCR tiene una CDR seleccionada del grupo que consiste en:

TCR N.º	CDR1 α	CDR2 α	CDR3 α	CDR1 β	CDR2 β	CDR3 β
19	TSINN	IRSNERE	MYDENGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
20	TSINN	IRSNERE	MYDQNGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY.

En los párrafos siguientes, el término "divulgación" se usa para describir la materia objeto que no se reivindica.

15 En algunos aspectos de la divulgación, las secuencias de referencia de las tres regiones CDR del dominio variable de cadena α de TCR se enumeran a continuación,

CDR1 α : TSINN

CDR2 α : IRSNERE

20 CDR3 α : ATDANGKII y contiene al menos una de las siguientes mutaciones:

Resto antes de la mutación	Resto después de la mutación
T en la posición 1 de la CDR1 α	G
S en la posición 2 de la CDR1 α	W
I en la posición 3 de la CDR1 α	A o V
N en la posición 4 de la CDR1 α	Q
S en la posición 3 de la CDR2 α	T
N en la posición 4 de la CDR2 α	G
E en la posición 5 de la CDR2 α	Q
R en la posición 6 de la CDR2 α	A o Q
A en la posición 1 de la CDR3 α	M
T en la posición 2 de la CDR3 α	Y
A en la posición 4 de la CDR3 α	E o Q
N en la posición 5 de la CDR3 α	F o Y o W
G en la posición 6 de la CDR3 α	A o Q
K en la posición 7 de la CDR3 α	W o R o T o S o M o L
I en la posición 8 de la CDR3 α	W o V o Y o P, y
I en la posición 9 de la CDR3 α	N o E o D o Q o V o K o G o M o S

y/o, el dominio variable de cadena β de TCR comprende tres regiones CDR, y las secuencias de referencia de las tres regiones CDR del dominio variable de cadena β de TCR se enumeran a continuación,

25

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

CDR3 β : ASSLGSNEQY y contiene al menos una de las siguientes mutaciones:

Resto antes de la mutación	Resto después de la mutación
N en la posición 3 de la CDR2 β	H
N en la posición 4 de la CDR2 β	G
V en la posición 5 de la CDR2 β	A
P en la posición 6 de la CDR2 β	V
S en la posición 3 de la CDR3 β	Q o M
L en la posición 4 de la CDR3 β	R o K o M, y
S en la posición 6 de la CDR3 β	A o G o P

30

En algunos aspectos de la divulgación, el número de mutaciones en la región CDR de la cadena α de TCR puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

35 En algunos aspectos de la divulgación, el número de mutaciones en la región CDR de la cadena β de TCR puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

ES 2 985 766 T3

En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de linfocitos T (TCR) de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, y dicho dominio variable de cadena α de TCR comprende CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α .

- 5 En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 α comprende una secuencia: [3 α X1][3 α X2]D[3 α X3][3 α X4][3 α X5][3 α X6][3 α X7][3 α X8], donde [3 α X1], [3 α X2], [3 α X3], [3 α X4], [3 α X5], [3 α X6], [3 α X7], [3 α X8] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.
- 10 En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X1] es A o M.
En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X2] es T o Y.
En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X3] es A o E o Q.
- 15 En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X4] es N o F o Y o W.
En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X5] es G o A o Q.
- 20 En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X6] es K o W o R o T o S o M o L.
En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X7] es I o W o V o Y o P.
En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X8] es I o N o E o D o Q o V o K o G o M o S.
- 25 En algunos aspectos de la divulgación, [3 α X1] es A, [3 α X2] es T, [3 α X3] es A, [3 α X4] es N o F o W, [3 α X5] es A, [3 α X6] es W o R, [3 α X7] es W, y [3 α X8] es I o N o E o D.
En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
30 ATDANARWN, ATDANARWE, ATDANARWD, ATDAFAWWI y ATDAWARWI.
- En algunos aspectos de la divulgación, la CDR1 α comprende una secuencia: [1 α X1][1 α X2][1 α X3][1 α X4]N, en donde [1 α X1], [1 α X2], [1 α X3], [1 α X4] y [1 α X5] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.
- 35 En algunos aspectos de la divulgación, [1 α X1] es T o G.
En algunos aspectos de la divulgación, [1 α X2] es S o W.
- 40 En algunos aspectos de la divulgación, [1 α X3] es I o A o V.
En algunos aspectos de la divulgación, [1 α X4] es N o Q.
- 45 En algunos aspectos de la divulgación, [1 α X1] es G, [1 α X2] es S o W, [1 α X3] es I o A o V, y [1 α X4] es Q.
En algunos aspectos de la divulgación, la CDR1 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
GSIQN, GWAQN, GWVQN y TSINN.
- 50 En algunos aspectos de la divulgación, la CDR2 α comprende una secuencia: IR [2 α X1][2 α X2][2 α X3][2 α X4]E, en donde [2 α X1], [2 α X2], [2 α X3], [2 α X4] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.
- 55 En algunos aspectos de la divulgación, [2 α X1] es S o T.
En algunos aspectos de la divulgación, [2 α X2] es N o G.
En algunos aspectos de la divulgación, [2 α X3] es E o Q.
- 60 En algunos aspectos de la divulgación, [2 α X4] es R, A o Q.
En algunos aspectos de la divulgación, CDR2 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
IRTGEQE, IRTGQAE e IRSNERE.
- 65 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR comprende un dominio variable de cadena TCR α y un dominio variable de cadena TCR β , y la cadena TCR β comprende CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , en donde la CDR1 β comprende

ES 2 985 766 T3

la secuencia: SGHDY.

En algunos aspectos de la divulgación, CDR2 β comprende una secuencia:

5 FN[2 β X1][2 β X2][2 β X3][2 β X4], en donde cada uno de [2 β X1], [2 β X2], [2 β X3] y [2 β X4] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

En algunos aspectos de la divulgación, [2 β X1] es N o H.

10 En algunos aspectos de la divulgación, [2 β X2] es N o G.

En algunos aspectos de la divulgación, [2 β X3] es V o A.

En algunos aspectos de la divulgación, [2 β X4] es P o V.

15 En algunos aspectos de la divulgación, CDR2 β comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: FNHGAV y FNNNVP.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 β comprende una secuencia: AS[3 β X1][3 β X2]G[3 β X3]NEQY, en donde [3 β X1], [3 β X2] y [3 β X3] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

20 En algunos aspectos de la divulgación, [3 β X1] es S, Q o M.

En algunos aspectos de la divulgación, [3 β X2] es L, R, K o M.

25 En algunos aspectos de la divulgación, [3 β X3] es S, A, G o P.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 β comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

30 ASQRGSNEQY, ASQKGANEQY, ASQLGSNEQY, ASQLGANEQY, ASQLGGNEQY, ASQLGPNEQY, ASQRGANEQY, ASQMGSNEQY, ASQMGANEQY y ASMLGSNEQY.

En algunos aspectos de la divulgación, el dominio variable de cadena TCR α del TCR no comprende simultáneamente las siguientes CDR:

35 CDR1 α : TSINN; CDR2 α : IRSNERE; y CDR3 α : ATDANGKII.

En algunos aspectos de la divulgación, el dominio variable de cadena TCR β del TCR no comprende simultáneamente las siguientes CDR: CDR1 β : SGHDY; CDR2 β : FNNNVP; y CDR3 β : ASSLSNEQY.

40 En algunos aspectos de la divulgación, la mutación se produce en una o más regiones CDR del dominio variable de cadena α y/o cadena β .

En algunos aspectos de la divulgación, la mutación se produce en CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena α , y/o la mutación se produce en CDR2 y/o CDR3 de la cadena β .

45 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 2 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente al menos 5 veces; más preferentemente al menos 10 veces.

50 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 50 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente, al menos 100 veces; más preferentemente, al menos 500 veces; mucho más preferentemente, al menos 1000 veces.

55 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 10^4 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente, al menos 10^5 veces; más preferentemente, al menos 10^6 veces; mucho más preferentemente, al menos 10^7 veces.

En particular, la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR al complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $\leq 20 \mu\text{M}$;

60 En algunos aspectos de la divulgación, la constante de equilibrio de disociación del TCR al complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $5 \mu\text{M} \leq K_D \leq 10 \mu\text{M}$; preferentemente, $0,1 \mu\text{M} \leq K_D \leq 1 \mu\text{M}$; más preferentemente, $1 \text{nM} \leq K_D \leq 100 \text{nM}$;

En algunos aspectos de la divulgación, la constante de equilibrio de disociación del TCR al complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $100 \text{pM} \leq K_D \leq 1000 \text{pM}$; preferentemente, $10 \text{pM} \leq K_D \leq 100 \text{pM}$; más preferentemente, $1 \text{pM} \leq K_D \leq 10 \text{pM}$.

65 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR tiene una CDR seleccionada del grupo que consiste en:

ES 2 985 766 T3

TCR N.º	CDR1 α	CDR2 α	CDR3 α	CDR1 β	CDR2 β	CDR3 β
1	TSINN	IRSNERE	ATDAFAWWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
2	GWAQN	FRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
3	GSIQN	FRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
4	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQRGSNEQY
5	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQKGANEQY
6	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
7	GWAQN	IRSNERE	ATDANARWN	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
8	GWVQN	FRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
9	GSIQN	IRSNERE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGANEQY
10	GWAQN	IRSNERE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
11	GSIQN	IRSNERE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQKGANEQY
12	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGNEQY
13	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQKGANEQY
14	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGPNEQY
15	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQRGANEQY
16	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGSNEQY
17	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGSNEQY
18	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGANEQY
19	TSINN	IRSNERE	MYDENGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
20	TSINN	IRSNERE	MYDQNGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
21	TSINN	IRSNERE	ATDAYGTVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
22	TSINN	IRSNERE	ATDANGTVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
23	TSINN	IRSNERE	ATDANGSVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
24	TSINN	IRSNERE	ATDAYGRII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
25	TSINN	IRSNERE	ATDANQMWK	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
26	TSINN	IRSNERE	ATDAYGLPI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
27	TSINN	IRSNERE	ATDANGLPV	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
28	TSINN	IRSNERE	ATDANGRWV	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
29	TSINN	IRSNERE	ATDANGTVG	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
30	TSINN	IRSNERE	ATDANGRWM	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
31	TSINN	IRSNERE	ATDANGLWS	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
32	GWAQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
33	GWAQN	IRTGQAE	ATDANARWE	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
34	GSIQN	IRSNERE	ATDAFAWWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
35	GWVQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
36	GWAQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
37	GWVQN	FRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
38	GSIQN	FRTGEQE	ATDAWARWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
39	GWVQN	IRTGQAE	ATDANARWE	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
40	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
41	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGSNEQY
42	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQRGSNEQY
43	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGSNEQY
44	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASMLGSNEQY

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es soluble.

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ o un TCR monocatenario.

5

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR de la presente divulgación es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$, y el dominio variable de cadena α del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %; más preferentemente, al menos un 92 %; mucho más preferentemente, al menos un 94 % (por ejemplo, puede ser al menos un 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1; y/o el dominio variable de cadena β del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 92 %; más preferentemente, al menos un 94 %; mucho más preferentemente al menos un 97 % (por ejemplo, puede ser al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

10

15

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR comprende (i) todo o parte de la cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de la cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción del dominio constante de la cadena de

TCR.

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$, y hay un enlace disulfuro intercatenario artificial contenido entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β del TCR.

5 En algunos aspectos de la divulgación, uno o más grupos de aminoácidos seleccionados de los siguientes se sustituyen por restos cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β del TCR:

10 aminoácido en la posición 46 de TRAV y aminoácido en la posición 60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
aminoácido en la posición 47 de TRAV y aminoácido en la posición 61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
aminoácido en la posición 46 de TRAV y aminoácido en la posición 61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; o
aminoácido en la posición 47 de TRAV y aminoácido en la posición 60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01.

15 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR que comprende un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β comprende un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β , así como todo o parte de los dominios constantes de cadena β distintos de su dominio transmembrana, sin embargo, no comprende el dominio constante de cadena α y el dominio variable de cadena α y la cadena β del TCR forman un heterodímero.

20 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR que comprende un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β comprende (i) todo o parte de la cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de la cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción de los dominios constantes de la cadena de TCR.

25 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ que comprende (i) todo o parte de la cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de la cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción del dominio constante de la cadena de TCR, y hay un enlace disulfuro intercatenario artificial contenido entre la región constante de cadena α y la región constante de cadena β .

30 En algunos aspectos de la divulgación, uno o más grupos de aminoácidos seleccionados de los siguientes se sustituyen por restos cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región constante de cadena α y la región constante de cadena β de TCR:

35 Thr48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Ser77 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Ser17 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
40 Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Asp59 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
Ser15 del exón 1 de TRAC*01 y Glu15 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
Arg53 del exón 1 de TRAC*01 y Ser54 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
Pro89 del exón 1 de TRAC*01 y Ala19 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; y
45 Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Glu20 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01.

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es un TCR monocatenario.

50 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR es un TCR monocatenario que consiste en un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β , y el dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β están conectados por una secuencia peptídica corta flexible (enlazador).

En algunos aspectos de la divulgación, el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α y/o dominio variable de cadena β de TCR está mutado.

55 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR, en el que el núcleo hidrófobo está mutado, es un TCR monocatenario que consiste en un dominio variable α y un dominio variable β , y el dominio variable α y el dominio variable β están conectados por una secuencia peptídica corta flexible (enlazador).

60 En algunos aspectos de la divulgación, basándose en el número que se muestra en la SEQ ID NO: 1, uno o más de entre los restos de aminoácidos 19A (es decir, la posición 19 de la región variable de cadena α enumerada en IMGT), 21M (es decir, la posición 21 de la región variable de cadena α enumerada en IMGT) y 79S (es decir, la posición 94 de la región variable de cadena α enumerada en IMGT) en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α del TCR de la presente divulgación están mutados, y/o basándose en el número que se muestra en la SEQ ID NO: 2, uno o más de entre los restos de aminoácidos 13T (es decir, la posición 13 de la región variable de cadena β enumerada en IMGT), 82S (es decir, la posición 94 de la región variable de cadena β enumerada en IMGT) en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena β del TCR están mutados.

ES 2 985 766 T3

- 5 En algunos aspectos de la divulgación, basándose en el número que se muestra en la SEQ ID NO: 1, el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α de la presente divulgación comprende uno o más de entre los restos de aminoácidos 19V, 21I y 79V y/o, basándose en el número que se muestra en la SEQ ID NO: 2, el núcleo hidrófobo del dominio variable β de TCR comprende uno o más de entre los restos de aminoácidos 13V y 82V. Más específicamente, la forma mutada del núcleo hidrófobo en el dominio variable de TCR α comprende uno o más de entre A19V, M21I y S79V; y la forma mutada del núcleo hidrófobo en el dominio variable de TCR β comprende uno o más de entre T13V y S82V.
- 10 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR de la presente divulgación es un TCR monocatenario, y el dominio variable de cadena α del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %; más preferentemente, al menos un 92 %; mucho más preferentemente al menos un 94 % (por ejemplo, puede ser al menos un 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3; y/o el dominio variable de cadena β del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 92 %; más preferentemente, al menos un 94 %; mucho más preferentemente al menos un 97 % (por ejemplo, puede ser al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.
- 20 En algunos aspectos de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena α del TCR se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 9-37 y 58-86; y/o la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena β del TCR se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 38-53 y 87-102.
- 25 En algunos aspectos de la divulgación, el TCR se selecciona del grupo que consiste en:

Número de TCR	Secuencia del dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
s-1	9	4
s-2	10	38
s-3	11	38
s-4	11	39
s-5	11	40
s-6	12	41
s-7	13	41
s-8	14	38
s-9	15	42
s-10	16	41
s-11	17	40
s-12	3	43
s-13	3	44
s-14	3	45
s-15	3	46
s-16	3	47
s-17	3	48
s-18	3	49
s-19	18	4
s-20	19	4
s-21	20	4
s-22	21	4
s-23	22	4
s-24	23	4
s-25	24	4
s-26	25	4
s-27	26	4
s-28	27	4
s-29	28	4
s-30	29	4
s-31	30	4
s-32	31	4
s-33	32	4
s-34	33	4
s-35	34	4

ES 2 985 766 T3

(continuación)

Número de TCR	Secuencia del dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
s-36	10	4
s-37	14	4
s-38	35	4
s-39	36	4
s-40	37	4
s-41	3	50
s-42	3	51
s-43	3	52
s-44	3	53

En algunos aspectos de la divulgación, el TCR se selecciona del grupo que consiste en:

Número de TCR	Secuencia del dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
1	58	2
2	59	87
3	60	87
4	60	88
5	60	89
6	61	90
7	62	90
8	63	87
9	64	91
10	65	90
11	66	89
12	1	92
13	1	93
14	1	94
15	1	95
16	1	96
17	1	97
18	1	98
19	67	2
20	68	2
21	69	2
22	70	2
23	71	2
24	72	2
25	73	2
26	74	2
27	75	2
28	76	2
29	77	2
30	78	2
31	79	2
32	80	2
33	81	2
34	82	2
35	83	2
36	59	2
37	63	2
38	84	2
39	85	2
40	86	2
41	1	99
42	1	100
43	1	101
44	1	102.

En algunos aspectos de la divulgación, un conjugado se une a la cadena α y/o cadena β del TCR en el extremo C o N.

En algunos aspectos de la divulgación, el conjugado que se une al TCR es un marcador detectable, un agente terapéutico, un resto modificado por PK, o una combinación de cualquiera de éstos.

5 En algunos aspectos de la divulgación, el agente terapéutico que se une al TCR es un anticuerpo anti-CD3 unido a la cadena α o β del TCR en el extremo C o N.

10 En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de linfocitos T (TCR) tiene la actividad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2 y comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, hay una mutación en el dominio variable de cadena α del TCR como se muestra en la SEQ ID NO: 1, y el sitio del resto de aminoácido mutado incluye uno o más de entre 27T, 28S, 29I, 30N, 51S, 52N, 53E, 54R, 90A, 91T, 93A, 94N, 95G, 96K, 97I y 98I, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 56 o 1; y/o hay una mutación en el dominio variable de cadena β del TCR como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y el sitio del resto de aminoácido mutado incluye uno o más de entre 51N, 52N, 53V, 54P, 95S, 96L y 98S, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 57 o 2.

20 En algunos aspectos de la divulgación, tras la mutación, el dominio variable de cadena α de TCR comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 27G, 28W, 29A o 29V, 30Q, 51T, 52G, 53Q, 54Q o 54A, 90M, 91Y, 93E o 93Q, 94F o 94Y o 94W, 95A o 95Q, 96W o 96R o 96T o 96S o 96M o 96L, 97W o 97V o 97Y o 97P, y 98E o 98N o 98D o 98Q o 98K o 98V o 98G o 98M o 98S, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y/o tras la mutación, el dominio variable de cadena β de TCR comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 51H, 52G, 53A, 54V, 95Q o 95M, 96R o 96K o 96M, y 98A o 98G o 98P, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

En un segundo aspecto de la divulgación, se proporciona un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos moléculas de TCR, y al menos una molécula de TCR es el TCR del primer aspecto de la divulgación.

30 En un tercer aspecto de la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de TCR del primer aspecto de la divulgación o el complejo de TCR multivalente del segundo aspecto de la divulgación, o una secuencia complementaria de la misma;

35 En un cuarto aspecto de la divulgación, se proporciona un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico del tercer aspecto de la divulgación.

En un quinto aspecto de la presente divulgación, se proporciona una célula hospedadora, que comprende el vector del cuarto aspecto de la presente divulgación o que tiene la molécula de ácido nucleico exógena del tercer aspecto de la presente divulgación integrada en su genoma.

40 En un sexto aspecto de la divulgación, se proporciona una célula aislada, que expresa el TCR del primer aspecto de la divulgación.

45 En un séptimo aspecto de la divulgación, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un TCR del primer aspecto de la divulgación, o un complejo de TCR del segundo aspecto de la divulgación, o la célula del sexto aspecto de la divulgación.

50 En un octavo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un TCR para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, que comprende administrar una cantidad adecuada del TCR del primer aspecto de la presente divulgación, o el complejo de TCR del segundo aspecto de la presente divulgación, o la célula del sexto aspecto de la divulgación, o la composición farmacéutica del séptimo aspecto de la divulgación a un sujeto que lo necesite.

Cualquier análisis de métodos de tratamiento dentro de la presente memoria descriptiva se refiere a compuestos para su uso en dichos tratamientos.

55 En un décimo aspecto de la divulgación, se proporciona un método para preparar el receptor de linfocitos T del primer aspecto de la divulgación, que comprende las etapas de:

- 60 (i) cultivar la célula hospedadora del quinto aspecto de la divulgación para expresar el receptor de linfocitos T del primer aspecto de la divulgación;
 (ii) aislar o purificar el receptor de linfocitos T.

Descripción de los dibujos

65 La Figura 1a y la Figura 1b muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y β de TCR de tipo silvestre que son capaces de unirse específicamente al complejo SLLMWITQC-HLA A2,

respectivamente.

La Figura 2a y la Figura 2b muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β del TCR molde monocatenario construido en la presente divulgación, respectivamente.

5 La Figura 3a y la Figura 3b muestran las secuencias de ADN del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β del TCR molde monocatenario construido en la presente divulgación, respectivamente.

La Figura 4a y la Figura 4b son la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos del péptido corto de unión (enlazador) del TCR molde monocatenario construido en la presente divulgación, respectivamente.

10 Las Figuras 5(1)-(29) muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α de TCR monocatenarios con alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2, respectivamente, y los restos mutados están subrayados.

Las Figuras 6(1)-(16) muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena β de TCR monocatenarios con alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2, respectivamente, y los restos mutados están subrayados.

15 La Figura 7a y la Figura 7b muestran la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN del TCR molde monocatenario construido en la presente divulgación, respectivamente.

Las Figuras 8a y 8b muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas α y β de TCR de referencia en la presente divulgación, respectivamente.

20 Las Figuras 9(1)-(29) muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α de un TCR heterodimérico con alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2, respectivamente, y los restos mutados están subrayados.

Las Figuras 10(1)-(16) muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena β de un TCR heterodimérico con alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2, respectivamente, y los restos mutados están subrayados.

25 La Figura 11a y la Figura 11b muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas α y β de TCR de tipo silvestre que son capaces de unirse específicamente al complejo SLLMWITQC-HLA A2, respectivamente.

La Figura 12 es una curva de unión de un TCR de referencia, es decir, TCR de tipo silvestre con complejo SLLMWITQC-HLA A2.

30 La Figura 13 muestra los resultados del experimento de activación de INF- γ de células efectoras transfectadas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación.

La Figura 14 muestra los resultados del experimento de destrucción de células efectoras transfectadas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación en células diana.

Las Figuras 15a y 15b muestran los resultados de los experimentos de redirección de proteínas de fusión en células efectoras.

35 La Figura 16 muestra los resultados de eficacia *in vivo* de las células efectoras transfectadas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación.

Modos para realizar la invención

40 A través de una investigación exhaustiva e intensa, los presentes inventores obtuvieron un receptor de linfocitos T (TCR) de alta afinidad que reconoce el péptido corto SLLMWITQC (derivado de la proteína NY-ESO-1) que se presenta en forma de complejo péptido-HLA A2. El TCR de alta afinidad tiene tres regiones CDR en su dominio variable de cadena α

45 CDR1 α : TSINN

CDR2 α : IRSNERE

CDR3 α : una mutación en ATDANGKII; y/o tres regiones CDR en su dominio variable de cadena β

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

50 CDR3 β : una mutación en ASSLGSNEQY; y, después de la mutación, la afinidad y/o semividua de unión del TCR de la presente divulgación para el complejo SLLMWITQC-HLA A2 anterior es al menos 2 veces mayor que la del TCR de tipo silvestre.

55 Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación, a menos que se defina otra cosa.

60 Aunque en la práctica o el ensayo de la presente divulgación pueden usarse cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente divulgación, los métodos y materiales preferidos se ejemplifican en el presente documento.

Término

Receptor de linfocitos T (TCR)

65 Puede usarse el Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT, por sus siglas en inglés) para

describir un TCR. Un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ nativo tiene una cadena α y una cadena β . En términos generales, cada cadena comprende una región variable, una región de unión y una región constante, y la cadena β normalmente también contiene una región hipervariable corta entre la región variable y la región de unión, que, sin embargo, con frecuencia se considera parte de la región de unión. La región de unión de TCR está determinada por los TRAJ y TRBJ únicos de IMGT, y la región constante de un TCR está determinada por TACT y TRBC de IMGT.

Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad), CDR1, CDR2 y CDR3, que son quiméricos en la secuencia armazón. En la nomenclatura IMGT, los diferentes números de TRAV y TRBV se refieren a diferentes tipos de $V\alpha$ y tipos de $V\beta$, respectivamente. En el sistema IMGT, existen los siguientes símbolos para el dominio constante de cadena α : TRAC*01, donde "TR" representa el gen del receptor de linfocitos T; "A" representa el gen de la cadena α ; C representa la región constante; "*01" representa el gen 1 del alelo. Existen los siguientes símbolos para el dominio constante de cadena β : TRBC1*01 o TRBC2*01, donde "TR" representa el gen del receptor de linfocitos T; "B" representa el gen de la cadena β ; C representa una región constante; "*01" representa el gen 1 del alelo. La región constante de la cadena α se define de forma única y, en la forma de cadena β , existen dos posibles genes de región constante "C1" y "C2". Un experto en la materia puede obtener secuencias génicas de región constante de cadenas α y β de TCR a través de la base de datos IMGT divulgada.

Generalmente se considera que las cadenas α y β del TCR tienen dos "dominios" respectivamente, es decir, dominio variable y dominio constante. El dominio variable consiste en una región variable conectada y una región de conexión. Por lo tanto, en la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente solicitud, "dominio variable de cadena α de TCR" se refiere a una región TRAV y TRAJ conectada y, análogamente, "dominio variable de cadena β de TCR" se refiere a una región TRBV y TRBD/TRBJ conectada. Las tres CDR del dominio variable de cadena α de TCR son CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α , respectivamente; y las tres CDR del dominio variable de cadena β de TCR son CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , respectivamente. Las secuencias armazón de los dominios variables de TCR de la divulgación pueden ser de origen murino o humano, preferentemente de origen humano. El dominio constante del TCR comprende una porción intracelular, región transmembrana y porción extracelular. Para obtener un TCR soluble para determinar la afinidad entre el TCR y el complejo SLLMWITQC-HLA A2, el TCR de la divulgación preferentemente no comprende una región transmembrana. Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos del TCR de la presente divulgación se refiere a la secuencia de aminoácidos extracelular del TCR.

La secuencia de aminoácidos de la cadena α y la secuencia de aminoácidos de la cadena β del "TCR de tipo silvestre" descrito en la presente divulgación son la SEQ ID NO: 103 y la SEQ ID NO: 104, respectivamente, como se muestra en las Fig. 11a y 11b. En la presente divulgación, la secuencia de aminoácidos de la cadena α y la secuencia de aminoácidos de la cadena β del "TCR de referencia" son la SEQ ID NO: 56 y la SEQ ID NO: 57, respectivamente, como se muestra en las Fig. 8a y 8b. En la presente divulgación, las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadenas α y β del TCR de tipo silvestre capaces de unirse al complejo SLLMWITQC-HLA A2 son la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente, como se muestra en las Figuras 1a y 1b. En la presente divulgación, las expresiones "polipéptido de la presente divulgación", "TCR de la presente divulgación" y "receptor de linfocitos T de la presente divulgación" se usan indistintamente.

En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de linfocitos T (TCR) de acuerdo con la divulgación comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, comprendiendo dicho dominio variable de cadena α de TCR CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α .

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 α comprende una secuencia: [3 α X1][3 α X2]D[3 α X3][3 α X4][3 α X5][3 α X6][3 α X7][3 α X8], donde [3 α X1], [3 α X2], [3 α X3], [3 α X4], [3 α X5], [3 α X6], [3 α X7], [3 α X8] se seleccionan independientemente de cualesquier restos de aminoácidos naturales.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X1] es A o M.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X2] es T o Y.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X3] es A o E o Q.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X4] es N o F o Y o W.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X5] es G o A o Q.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X6] es K o W o R o T o S o M o L.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X7] es I o W o V o Y o P.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X8] es I o N o E o D o Q o V o K o G o M o S.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 α X1] es A, [3 α X2] es T, [3 α X3] es A, [3 α X4] es N o F o W, [3 α X5] es A,

ES 2 985 766 T3

[3 α X6] es W o R, [3 α X7] es W y [3 α X8] es I o N o E o D.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

5 ATDANARWN, ATDANARWE, ATDANARWD, ATDAFAWWI y ATDAWARWI.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR1 α comprende una secuencia:

[1 α X1][1 α X2][1 α X3][1 α X4]N, en donde [1 α X1], [1 α X2], [1 α X3], [1 α X4], [1 α X5] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

10 En algunos aspectos de la divulgación, el [1 α X1] es T o G.

En algunos aspectos de la divulgación, el [1 α X2] es S o W.

15 En algunos aspectos de la divulgación, el [1 α X3] es I o A o V.

En algunos aspectos de la divulgación, el [1 α X4] es N o Q.

20 En algunos aspectos de la divulgación, el [1 α X1] es G, [1 α X2] es S o W, [1 α X3] es I o A o V y [1 α X4] es Q.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR1 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

GSIQN, GWAQN, GWVQN y TSINN.

25 En algunos aspectos de la divulgación, la CDR2 α comprende una secuencia:

IR [2 α X1][2 α X2][2 α X3][2 α X4]E, en donde [2 α X1], [2 α X2], [2 α X3], [2 α X4] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

30 En algunos aspectos de la divulgación, el [2 α X1] es S o T.

En algunos aspectos de la divulgación, el [2 α X2] es N o G.

En algunos aspectos de la divulgación, el [2 α X3] es E o Q.

35 En algunos aspectos de la divulgación, el [2 α X4] es R, A o Q.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR2 α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

IRTGEQE, IRTGQAE e IRSNERE.

40 En algunos aspectos de la presente divulgación, el TCR comprende un dominio variable de cadena TCR α y un dominio variable de cadena TCR β , y el dominio variable de cadena TCR β comprende CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , en donde la CDR1 β comprende una secuencia: SGHDY.

45 En algunos aspectos de la divulgación, la CDR2 β comprende una secuencia:

FN[2 β X1][2 β X2][2 β X3][2 β X4], en donde cada uno de [2 β X1], [2 β X2], [2 β X3] y [2 β X4] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

50 En algunos aspectos de la divulgación, el [2 β X1] es N o H.

En algunos aspectos de la divulgación, el [2 β X2] es N o G.

En algunos aspectos de la divulgación, el [2 β X3] es V o A.

55 En algunos aspectos de la divulgación, el [2 β X4] es P o V.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR2 β comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

FNHGAV y FNNNVP.

60 En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3 β comprende una secuencia: AS[3 β X1][3 β X2]G[3 β X3]NEQY, en donde [3 β X1], [3 β X2], [3 β X3] se seleccionan independientemente de cualquier resto de aminoácido natural.

65 En algunos aspectos de la divulgación, el [3 β X1] es S, Q o M.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3 β X2] es L, R, K o M.

En algunos aspectos de la divulgación, el [3βX3] es S, A, G o P.

En algunos aspectos de la divulgación, la CDR3β comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

ASQRGSNEQY, ASQKGANEQY, ASQLGSNEQY, ASQLGANEQY, ASQLGGNEQY, ASQLGPNEQY, ASQRGANEQY, ASQMGSNEQY, ASQMGANEQY y ASMLGSNEQY.

En algunos aspectos de la divulgación, el dominio variable de cadena TCRα del TCR no comprende simultáneamente las siguientes CDR:

CDR1α: TSINN; CDR2α: IRSNERE; y CDR3α: ATDANGKII.

En algunos aspectos de la divulgación, el dominio variable de cadena TCRβ del TCR no comprende simultáneamente las siguientes CDR: CDR CDR1β: SGHDY; CDR2β: FNNNVP; y CDR3β: ASSLGSNEQY.

Enlace disulfuro intercatenario natural y enlace disulfuro intercatenario artificial

Hay un grupo de enlaces disulfuro entre las cadenas Cα y Cβ en la región proximal a la membrana de un TCR nativo, que se denomina en el presente documento "enlace disulfuro intercatenario natural". En la presente divulgación, un enlace disulfuro covalente intercatenario que se introduce artificialmente y cuya posición es diferente de la posición de un enlace disulfuro intercatenario natural se denomina "enlace disulfuro intercatenario artificial".

Para facilitar la descripción, en la presente divulgación, las posiciones de las secuencias de aminoácidos de TRAC*01 y TRBC1*01 o TRBC2*01 se numeran secuencialmente en orden del extremo N al extremo C. Por ejemplo, el 60.º aminoácido en el orden del extremo N al extremo C en TRBC1*01 o TRBC2*01 es P (valina), que puede describirse como Pro60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 en la presente divulgación, y también puede expresarse como el aminoácido en la posición 60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01. Para otro ejemplo, el 61.º aminoácido en el orden del extremo N al extremo C en TRBC1*01 o TRBC2*01 es Q (glutamina), que puede describirse como Gln61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 en la divulgación, y también puede expresarse como el aminoácido en la posición 61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01, y así sucesivamente. En la presente divulgación, las posiciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables TRAV y TRBV se numeran de acuerdo con las posiciones enumeradas en IMGT. En cuanto a un aminoácido en TRAV, la posición se numera como 46 en IMGT, que se describe en la presente divulgación como el aminoácido en la posición 46 de TRAV, y así sucesivamente. En la presente divulgación, si las posiciones de secuencia de otros aminoácidos se describen específicamente, prevalecerá la descripción especial.

Tumor

El término "tumor" se refiere a incluir todos los tipos de crecimiento de células cancerosas o procesos carcinogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignos, independientemente del tipo patológico o fase de la infección. Los ejemplos de tumores incluyen, sin limitación, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos o lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen: tumores malignos de diferentes sistemas de órganos, tales como sarcoma, carcinoma de células escamosas de pulmón y cáncer. Por ejemplo: próstata infectada, pulmón, mama, linfa, tracto gastrointestinal (por ejemplo, colon) y genitourinario (por ejemplo, riñón, células epiteliales), faringe. El carcinoma de células escamosas de pulmón incluye tumores malignos, por ejemplo, la mayor parte del cáncer de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados pueden análogamente tratarse y prevenirse usando los métodos y composiciones de la presente divulgación.

Descripción detallada

Es bien sabido que el dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β de un TCR contienen tres CDR (similares a las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos), respectivamente. CDR3 interactúa con el péptido corto antigénico y CDR1 y CDR2 interactúan con HLA. Por lo tanto, la CDR de una molécula de TCR determina su interacción con el complejo péptido corto antigénico-HLA. Las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β de un TCR de tipo silvestre capaz de unirse al complejo de péptido corto antigénico SLLMWITQC y HLA A2 (es decir, complejo SLLMWITQC-HLA A2) son la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Esta secuencia fue descubierta por primera vez por los inventores. Tiene las siguientes regiones CDR:

CDR de dominio variable de cadena α CDR1: TSINN

CDR2α: IRSNERE

CDR3α: ATDANGKII

y CDR de dominio variable de cadena β CDR1β: SGHDY

CDR2 β : FNNNVP
 CDR3 β : ASSLSGSNEQY

5 En la presente divulgación, se obtiene un TCR de alta afinidad sometiendo a mutación y cribado en las regiones CDR anteriores, que tiene una afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 que es al menos 2 veces superior a la de un TCR de tipo silvestre por el complejo SLLMWITQC-HLA A2.

10 En la presente divulgación, se proporciona un receptor de linfocitos T (TCR), que tiene actividad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2.

El receptor de linfocitos T comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, el dominio variable de cadena α de TCR comprende tres regiones CDR, y las secuencias de referencia de las tres regiones CDR en el dominio variable de cadena α de TCR se enumeran a continuación,

CDR1 α : TSINN

15 CDR2 α : IRSNERE

CDR3 α : ATDANGKII y contienen al menos una de las siguientes mutaciones:

Resto antes de la mutación	Resto después de la mutación
T en la posición 1 de la CDR1 α	G
S en la posición 2 de la CDR1 α	W
I en la posición 3 de la CDR1 α	A o V
N en la posición 4 de la CDR1 α	Q
S en la posición 3 de la CDR2 α	T
N en la posición 4 de la CDR2 α	G
E en la posición 5 de la CDR2 α	Q
R en la posición 6 de la CDR2 α	A o Q
A en la posición 1 de la CDR3 α	M
T en la posición 2 de la CDR3 α	Y
A en la posición 4 de la CDR3 α	E o Q
N en la posición 5 de la CDR3 α	F o Y o W
G en la posición 6 de la CDR3 α	A o Q
K en la posición 7 de la CDR3 α	W o R o T o S o M o L
I en la posición 8 de la CDR3 α	W o V o Y o P, y
I en la posición 9 de la CDR3 α	N o E o D o Q o V o K o G o M o S

20 Y/o, el dominio variable de cadena β de TCR comprende tres regiones CDR, y las secuencias de referencia de las tres regiones CDR del dominio variable de cadena β de TCR se enumeran a continuación,

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

CDR3 β : ASSLSGSNEQY y contienen al menos una de las siguientes mutaciones:

Resto antes de la mutación	Resto después de la mutación
N en la posición 3 de la CDR2 β	H
N en la posición 4 de la CDR2 β	G
V en la posición 5 de la CDR2 β	A
P en la posición 6 de la CDR2 β	V
S en la posición 3 de la CDR3 β	Q o M
L en la posición 4 de la CDR3 β	R o K o M, y
S en la posición 6 de la CDR3 β	A o G o P

25 Con más detalle, el número de mutaciones en la región CDR de la cadena α de TCR es 3 o 4 o 6 u 8 o 9 u 11 o 12; y/o el número de mutaciones en la región CDR de la cadena β de TCR es 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7.

30 Además, el TCR de la presente divulgación es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$, y el dominio variable de cadena α del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %; más preferentemente, al menos un 92 %; mucho más preferentemente al menos un 94 % (por ejemplo, puede ser al menos un 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1; y/o el dominio variable de cadena β del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 92 %; más preferentemente, al menos un 94 %; mucho más preferentemente al menos un 97 % (por ejemplo, puede ser al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Además, el TCR de la presente divulgación es un TCR monocatenario, y el dominio variable de cadena α del TCR

- comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %; más preferentemente, al menos un 92 %; mucho más preferentemente al menos un 94 % (por ejemplo, puede ser al menos un 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3; y/o el dominio variable de cadena β del TCR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 92 %; más preferentemente, al menos un 94 %; mucho más preferentemente al menos un 97 % (por ejemplo, puede ser al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia) de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.
- 10 Preferentemente, el TCR comprende (i) todo o parte de una cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de una cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción del dominio constante de la cadena de TCR.

15 En la presente divulgación, las tres CDR del dominio variable de cadena α SEQ ID NO: 1 del TCR de tipo silvestre, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 están ubicadas en las posiciones 27-31, 49-55 y 90-98 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente. En consecuencia, el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 1, 27T es T en la primera posición de la CDR1α, 28S es S en la segunda posición de la CDR1α, 29I es I en la tercera posición de la CDR1α, 30N es N en la 4.^a posición de la CDR1α, 51S es S en la 3.^a posición de la CDR2α, 52N es N en la 4.^a posición de la CDR2α, 53E es E en la 5.^a posición de la CDR2α, 54R es R en la 6.^a posición de la CDR2α, 90A es A en la primera posición de la CDR3α, 91T es T en la segunda posición de la CDR3α, 93A es A de la 4.^a posición de la CDR3α, 94N es N en la 5.^a posición de la CDR3α, 95G es G en la 6.^a posición de la CDR3α, 96K es K en la 7.^a posición de la CDR3α, 97I es I en la 8.^a posición de la CDR3α y 98I es I en la 9.^a posición de la CDR3α.

25 De manera similar, en la presente divulgación, las tres CDR del dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2 del TCR de tipo silvestre, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 están ubicadas en las posiciones 27-31, 49-54 y 93-102 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Por lo tanto, el número de resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 2, 51N es N en la 3.^a posición de la CDR2β, 52N es N en la 4.^a posición de la CDR2β, 53V es V en la 5.^a posición de la CDR2β, 54P es P en la 6.^a posición de la CDR2β, 95S es S en la 3.^a posición de la CDR3β, 96L es L en la 4.^a posición de la CDR3β y 98S es S en la 6.^a posición de la CDR3β.

30 La presente divulgación proporciona un TCR que tiene la propiedad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2, y comprende un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β, en donde el TCR tiene una mutación en el dominio variable de cadena α que se muestra en la SEQ ID NO: 1, y el sitio del resto de aminoácido mutado incluye uno o más de entre 27T, 28S, 29I, 30N, 51S, 52N, 53E, 54R, 90A, 91T, 93A, 94N, 95G, 96K, 97I e 98I, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y/o el TCR tiene una mutación en el dominio variable de cadena β que se muestra en la SEQ ID NO: 2, y el sitio del resto de aminoácido mutado incluye uno o más de entre 51N, 52N, 53V, 54P, 95S, 96L y 98S, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 2;

40 Preferentemente, el dominio variable de cadena α de TCR mutado comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 27G, 28W, 29A o 29V, 30Q, 51T, 52G, 53Q, 54Q o 54A, 90M, 91Y, 93E o 93Q, 94F o 94Y o 94W, 95A o 95Q, 96W o 96R o 96T o 96S o 96M o 96L, 97W o 97V o 97Y o 97P, y 98E o 98N o 98D o 98Q o 98K o 98V o 98W o 98G o 98M o 98S, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y/o el dominio variable de cadena β de TCR mutado comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 51H, 52G, 53A, 54V, 95Q o 95M, 96R o 96K o 96M, y 98A o 98G o 98P, en donde el resto de aminoácido se numera como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

50 Más específicamente, en el dominio variable de cadena α, las formas específicas de la mutación incluyen uno o más grupos de entre T27G, S28W, I29A/V, N30Q, S51T, N52G, E53Q, R54Q/A, A90M, T91Y, A93E/Q, N94F/Y/W, G95A/Q, K96W/R/T/S/M/L, I97W/V/Y/P e I98N/E/D/Q/K/V/G/M/S; y en el dominio variable de cadena β, las formas específicas de la mutación incluyen uno o más grupos de entre N51H, N52G, V53A, P54V, S95Q/M, L96R/K/M y S98A/G/P.

55 Thr48 del exón 1 de TRAC*01 de región constante de cadena α de TCR de tipo silvestre se mutó a cisteína de acuerdo con el método de mutagénesis dirigida al sitio bien conocido por un experto en la materia, y Ser57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 de la región constante de cadena β se mutó a cisteína, para obtener un TCR de referencia, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las Figuras 8a y 8b, respectivamente, y los restos cisteína mutados se indican con letras en negrita. Las sustituciones de cisteína anteriores pueden formar un enlace disulfuro intercatenario artificial entre las regiones constantes de las cadenas α y β del TCR de referencia para formar un TCR soluble más estable, de manera que sea más fácil evaluar la afinidad de unión y/o la semivida de unión entre TCR y el complejo SLLMWITQC-HLA A2. Se apreciará que las regiones CDR de la región variable de TCR determinan su afinidad por el complejo pMHC, por lo tanto, las sustituciones de cisteína anteriores en la región constante del TCR no afectarán a la afinidad de unión y/o semivida de unión del TCR. Por lo tanto, en la presente divulgación, la afinidad de unión medida entre el TCR de referencia y el complejo SLLMWITQC-HLA A2 se considera la afinidad de unión entre el TCR de tipo silvestre y el complejo SLLMWITQC-HLA A2. De manera similar, si se determina que la afinidad de unión entre el TCR de la divulgación y el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos

10 veces la afinidad de unión entre el TCR de referencia y el complejo SLLMWITQC-HLA A2, la afinidad de unión entre el TCR de la presente divulgación y el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 10 veces la afinidad de unión entre el TCR de tipo silvestre y el complejo SLLMWITQC-HLA A2.

5 La afinidad de unión (en proporción inversa a la constante de equilibrio de disociación K_D) y la semivida de unión (expresada como $T_{1/2}$) puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Debe entenderse que duplicar la afinidad del TCR reducirá a la mitad la K_D . $T_{1/2}$ se calcula como $\ln 2$ dividido por la velocidad de disociación ($K_{\text{disociación}}$). Por lo tanto, la duplicación de $T_{1/2}$ reducirá a la mitad la $K_{\text{disociación}}$. Preferentemente, la afinidad de unión o semivida de unión de un TCR dado se detecta varias veces usando el mismo protocolo de ensayo, por ejemplo, 3
10 o más veces, y se toma el promedio de los resultados. En algunos aspectos de la divulgación, estas mediciones se realizan usando el método de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) en los Ejemplos del presente documento. La constante de equilibrio de disociación K_D del TCR de referencia al complejo SLLMWITQC-HLA A2 se detecta como $4,3E-05$ M, es decir, $43 \mu\text{M}$ mediante el método, y en la presente divulgación, la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR de tipo silvestre al complejo SLLMWITQC-HLA A2 también se considera $43 \mu\text{M}$. Puesto que
15 duplicar la afinidad del TCR reducirá a la mitad la K_D , si la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR de alta afinidad al complejo SLLMWITQC-HLA A2 se detecta como $4,3E-06$ M, es decir, $4,3 \mu\text{M}$, la afinidad del TCR de alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es 10 veces la del TCR de tipo silvestre por el complejo SLLMWITQC-HLA A2. Un experto en la materia está familiarizado con la relación de conversión entre unidades de valor de K_D , es decir, $1 \text{ M} = 1000 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M} = 1000 \text{ nM}$ y $1 \text{ nM} = 1000 \text{ pM}$.

20 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 2 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente al menos 5 veces; más preferentemente al menos 10 veces.

25 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 50 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente, al menos 100 veces; más preferentemente, al menos 500 veces; mucho más preferentemente, al menos 1000 veces.

30 En algunos aspectos de la divulgación, la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es al menos 10^4 veces la del TCR de tipo silvestre; preferentemente, al menos 10^5 veces; más preferentemente, al menos 10^6 veces; mucho más preferentemente, al menos 10^7 veces.

Específicamente, la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR para el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $\leq 20 \mu\text{M}$;

35 En algunos aspectos de la divulgación, la constante de equilibrio de disociación del TCR para el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $5 \mu\text{M} \leq K_D \leq 10 \mu\text{M}$; preferentemente, $0,1 \mu\text{M} \leq K_D \leq 1 \mu\text{M}$; más preferentemente, $1 \text{ nM} \leq K_D \leq 100 \text{ nM}$;

40 En algunos aspectos de la divulgación, la constante de equilibrio de disociación del TCR para el complejo SLLMWITQC-HLA A2 es $100 \text{ pM} \leq K_D \leq 1000 \text{ pM}$; preferentemente, $10 \text{ pM} \leq K_D \leq 100 \text{ pM}$; más preferentemente, $1 \text{ pM} \leq K_D \leq 10 \text{ pM}$.

45 Las mutaciones pueden realizarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitación, aquellos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la clonación basada en enzimas de restricción o métodos de clonación independientes de la unión (LIC, por sus siglas en inglés). Muchos libros de texto de referencia de biología molecular describen estos métodos en detalle. Pueden encontrarse más detalles sobre la mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación basada en enzimas de restricción en Sambrook y Russell, (2001) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (Tercera edición) CSHL Publishing house. Puede encontrar más información sobre el método de LIC en Rashtchiano, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6(1): 30-6.

50 El método para producir el TCR de la presente divulgación puede ser, pero sin limitación, cribar para detectar un TCR que tenga alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 a partir de una biblioteca diversa de partículas de fagos que presentan dichos TCR, como se describe en la bibliografía (Li, *et al.*). (2005) *Nature Biotech* 23(3): 349-354).

55 Se apreciará que pueden usarse genes que expresan aminoácidos del dominio variable de cadena α y β de un TCR de tipo silvestre o genes que expresan aminoácidos del dominio variable de cadena α y β de un TCR de tipo silvestre ligeramente modificado para preparar TCR molde. Después se introducen los cambios necesarios para producir el TCR de alta afinidad de la divulgación en el ADN que codifica el dominio variable del TCR molde.

60 El TCR de alta afinidad de la presente divulgación comprende una de entre las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena α de las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y/o una de entre las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena β de las SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102. Por lo tanto, una cadena α de TCR que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena α del TCR de tipo
65 silvestre (SEQ ID NO: 1) puede unirse a una cadena β de TCR que comprende una de entre las SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 para formar un TCR heterodimérico o una molécula de TCR

monocatenario. Como alternativa, una cadena β de TCR que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable β del TCR de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) puede unirse a una cadena α de TCR que comprende una de entre las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 para formar un TCR heterodimérico o molécula de TCR monocatenario. Como alternativa, una cadena α de TCR que comprende una de entre las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena α de TCR SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 puede unirse a una cadena β de TCR que comprende una de las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena β de TCR SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 para formar un TCR heterodimérico o una molécula de TCR monocatenario. En la presente divulgación, las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β que forman la molécula de TCR heterodimérica se seleccionan preferentemente de la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Número de TCR	Secuencia de dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia de dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
1	58	2
2	59	87
3	60	87
4	60	88
5	60	89
6	61	90
7	62	90
8	63	87
9	64	91
10	65	90
11	66	89
12	1	92
13	1	93
14	1	94
15	1	95
16	1	96
17	1	97
18	1	98
19	67	2
20	68	2
21	69	2
22	70	2
23	71	2
24	72	2
25	73	2
26	74	2
27	75	2
28	76	2
29	77	2
30	78	2
31	79	2
32	80	2
33	81	2
34	82	2
35	83	2
36	59	2
37	63	2
38	84	2
39	85	2
40	86	2
41	1	99
42	1	100
43	1	101
44	1	102

15 Para los fines de la presente divulgación, el TCR de la divulgación es un resto que tiene al menos un dominio variable de cadena α de TCR y/o β de TCR. Por lo general, comprenden tanto el dominio variable de cadena α de TCR como el dominio variable de cadena β de TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ o formas monocatenarias o cualesquier otras formas estables. En la inmunoterapia adoptiva, puede transfectarse la cadena de longitud

completa del TCR heterodimérico $\alpha\beta$ (incluyendo los dominios citoplasmático y transmembrana). El TCR de la presente divulgación puede usarse como agente de direccionamiento para suministrar un agente terapéutico a una célula presentadora de antígeno o en combinación con otras moléculas para preparar un polipéptido bifuncional para dirigir células efectoras, cuando el TCR está preferentemente en forma soluble.

5 Para la estabilidad, en la técnica anterior se divulga que puede obtenerse una molécula de TCR soluble y estable introduciendo un enlace disulfuro intercatenario artificial entre los dominios constantes de cadena α y β de un TCR, como se describe en el documento PCT/CN2015/093 806. Por lo tanto, el TCR de la divulgación puede ser un TCR en el que se introduce un enlace disulfuro intercatenario artificial entre los restos de sus dominios constantes de cadena α y β . Los restos cisteína forman un enlace disulfuro intercatenario artificial entre los dominios constantes de cadena α y β del TCR. Un resto cisteína puede reemplazar otro resto de aminoácido en una posición adecuada en un TCR nativo para formar un enlace disulfuro intercatenario artificial. Por ejemplo, Thr48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 pueden reemplazarse para formar un enlace disulfuro. Otros sitios para introducir un resto cisteína para formar un enlace disulfuro pueden ser: Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Ser77 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Ser17 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Asp59 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Ser15 del exón 1 de TRAC*01 y Glu15 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Arg53 del exón 1 de TRAC*01 y Ser54 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Pro89 del exón 1 de TRAC*01 y Ala19 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; o Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Glu20 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01. Es decir, los restos cisteína reemplazan cualquier grupo de los sitios mencionados anteriormente en los dominios constantes de cadena α y β . Pueden truncarse un máximo de 15, o un máximo de 10, o un máximo de 8 o menos aminoácidos en uno o más extremos C del dominio constante del TCR de la divulgación de manera que no incluya restos cisteína para lograr el fin de eliminar los enlaces disulfuro intercatenarios nativos, o los restos cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario naturales también pueden mutarse a otro aminoácido para lograr el fin anterior.

25 Como se ha descrito anteriormente, el TCR de la presente divulgación puede comprender un enlace disulfuro intercatenario artificial introducido entre restos de sus dominios constantes de cadena α y β . Cabe señalar que el enlace disulfuro artificial introducido como se ha descrito anteriormente puede estar contenido o no contenido entre los dominios constantes, y el TCR de la presente divulgación puede contener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2. La secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden unirse mediante un enlace disulfuro intercatenario natural presente en el TCR.

35 Adicionalmente, en cuanto a la estabilidad, en una bibliografía de patente PCT/CN2016/077680 también se divulgó que la introducción de un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β de un TCR puede mejorar significativamente la estabilidad del TCR. Por lo tanto, un enlace disulfuro intercatenario artificial puede estar contenido entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β de un TCR de alta afinidad de la presente divulgación. Específicamente, los restos cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región variable de cadena α y la región constante de cadena β del TCR sustituyen: un aminoácido en la posición 46 de TRAV y aminoácido en la posición 60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; un aminoácido en la posición 47 de TRAV y aminoácido en la posición 61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; aminoácido en la posición 46 de TRAV y aminoácido en la posición 61 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; o un aminoácido en la posición 47 de TRAV y aminoácido en la posición 60 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01. Preferentemente, dicho un TCR puede comprender (i) todo o parte de la cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de la cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción de los dominios constantes de la cadena de TCR, y la cadena α y la cadena β forman un heterodímero. Más preferentemente, dicho TCR puede comprender un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β y todo o parte del dominio constante de cadena β distinto del dominio transmembrana, que, sin embargo, no comprende el dominio constante de cadena α , y el dominio variable de cadena α del TCR y la cadena β forman un heterodímero.

50 Para la estabilidad, en otro aspecto, el TCR de la presente divulgación también incluye un TCR que tiene una mutación en su región central hidrófoba, y estas mutaciones en la región central hidrófoba son preferentemente mutaciones capaces de aumentar la estabilidad del TCR de la presente divulgación, como se describe en el documento WO 2014/206304. Un TCR de este tipo puede tener mutaciones en las siguientes posiciones en el núcleo hidrófobo del dominio variable: (cadena α y/o β) aminoácidos de la región variable en la posición 11, 13, 19, 21, 53, 76, 89, 91, 94, y/o aminoácido peptídico corto del gen J de cadena α (TRAJ) en las posiciones recíprocas 3, 5, 7 y/o aminoácido peptídico corto del gen J de cadena β (TRBJ) en las posiciones recíprocas 2, 4, 6, en donde las posiciones en la secuencia de aminoácidos se numeran de acuerdo con los números de posición enumerados en el Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). Un experto en la materia conocerá el sistema de información inmunogenética internacional descrito anteriormente y podrá obtener los números de posición de los restos de aminoácidos de diferentes TCR en el IMGT basándose en la base de datos.

65 Más específicamente, en la presente divulgación, un TCR en el que hay una mutación en la región central hidrófoba puede ser un TCR monocatenario de alta estabilidad que consiste en dominios variables de cadena α y β de TCR unidos por una cadena peptídica flexible. Las regiones CDR de la región variable de TCR determinan su afinidad por

el complejo péptido corto-HLA, y las mutaciones en el núcleo hidrófobo pueden aumentar la estabilidad del TCR, pero no afectarán a su afinidad por el complejo péptido corto-HLA. Cabe señalar que la cadena peptídica flexible en la presente divulgación puede ser cualquier cadena peptídica adecuada para unir dominios variables de cadena α y β de TCR. La cadena molde construida en el Ejemplo 1 de la presente divulgación para cribar los TCR de alta afinidad es un TCR monocatenario de alta estabilidad que contiene mutaciones en el núcleo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. La afinidad entre un TCR y un complejo SLLMWITQC-HLA-A2 se puede evaluar fácilmente usando un TCR con mayor estabilidad.

Las regiones CDR del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β del TCR molde monocatenario son idénticas a las regiones CDR del TCR de tipo silvestre. Es decir, las tres CDR del dominio variable de cadena α son CDR1 α : TSINN, CDR2 α : IRSNERE y CDR3 α : ATDANGKII y las tres CDR de los dominios variables de cadena β son CDR1 β : SGHDY, CDR2 β : FNNNVP y CDR3 β : ASSLGSNEQY, respectivamente. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 55) del TCR molde monocatenario se muestran en las Figuras 7a y 7b, respectivamente, cribando de este modo un TCR monocatenario que consiste en un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β y que tiene una alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA A2.

En la presente divulgación, las tres CDR del dominio variable de cadena α del TCR molde monocatenario (SEQ ID NO: 3), es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 están ubicadas en las posiciones 27-31, 49-55 y 90-98 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En consecuencia, los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el número como se muestra en la SEQ ID NO: 3. 27T es T en la primera posición de la CDR1 α , 28S es S en la segunda posición de la CDR1 α , 29I es I en la tercera posición de la CDR1 α , 30N es N en la 4.^a posición de la CDR1 α , 51S es S en la 3.^a posición de la CDR2 α , 52N es N en la 4.^a posición de la CDR2 α , 53E es E en la 5.^a posición de la CDR2 α , 54R es R en la 6.^a posición de la CDR2 α , 90A es A en la primera posición de la CDR3 α , 91T es T en la segunda posición de la CDR3 α , 93A es A en la 4.^a posición de la CDR3 α , 94N es N en la 5.^a posición de la CDR3 α , 95G es G en la 6.^a posición de la CDR3 α , 96K es K en la 7.^a posición de la CDR3 α , 97I es I en la 8.^a posición de la CDR3 α y 98I es I en la 9.^a posición de la CDR3 α .

De manera similar, en la presente divulgación, las tres CDR del dominio variable de cadena β del TCR molde monocatenario (SEQ ID NO: 4), es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 están ubicadas en las posiciones 27-31, 49-54 y 93-102 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Por lo tanto, los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el número como se muestra en la SEQ ID NO: 2. 51N es N en la 3.^a posición de la CDR2 β , 52N es N en la 4.^a posición de la CDR2 β , 53V es V en la 5.^a posición de la CDR2 β , 54P es P en la 6.^a posición de la CDR2 β , 95S es A en la 3.^a posición de la CDR3 β , 96L es L en la 4.^a posición de la CDR3 β y 98S es S en la 6.^a posición de la CDR3 β .

El heterodímero $\alpha\beta$ de la presente divulgación que tiene alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 se obtiene transfiriendo las regiones CDR de los dominios variables de cadena α y β del TCR monocatenario de alta afinidad seleccionado a las posiciones correspondientes del dominio variable de cadena α (SEQ ID NO: 1) y el dominio variable de cadena β (SEQ ID NO: 2) de un TCR de tipo silvestre.

En algunos aspectos de la divulgación, cuando se usa la numeración expuesta en la SEQ ID NO: 1, uno o más de entre el resto de aminoácido 19A (es decir, la 19.^a posición de la región variable de cadena α enumerada en IMGT), 21M (es decir, la 21.^a posición de la región variable de cadena α enumerada en IMGT) y 79S (es decir, la 94.^a posición de la región variable de cadena α enumerada en IMGT) en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α del TCR de la divulgación muta y/o cuando se usa la numeración expuesta en la SEQ ID NO: 2, uno o más de entre los restos de aminoácidos 13T (es decir, la 13.^a posición de la región variable de cadena β enumerada en IMGT) y 82S (es decir, la 94.^a posición de la región variable de cadena β enumerada en IMGT) en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena β del TCR muta.

Más específicamente, en algunos aspectos de la divulgación, cuando se usa la numeración expuesta en la SEQ ID NO: 1, uno o más de entre los restos de aminoácidos 19V, 21I y 79V están contenidos en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α de la divulgación y/o cuando se usa la numeración expuesta en la SEQ ID NO: 2, uno o más de entre los restos de aminoácidos 13V y 82V están contenidos en el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena TCR β . Más específicamente, la forma mutada del núcleo hidrófobo de dominio variable de TCR α comprende uno o más de entre A19V, M21I y S79V; y la forma mutada del núcleo hidrófobo de dominio variable de TCR β comprende uno o más de entre T13V y S82V.

El TCR de alta afinidad de la divulgación comprende además una de entre las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena α de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37 y/o una de entre las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena β de las SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53. Por lo tanto, el dominio variable de cadena α (SEQ ID NO: 3) del TCR monocatenario de alta estabilidad descrito anteriormente como cadena molde puede combinarse con el dominio variable de cadena β de TCR, cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 o 53, para formar la molécula de TCR monocatenario. Como alternativa, el dominio variable de cadena β (SEQ ID NO: 4) del TCR monocatenario de alta estabilidad descrito anteriormente como cadena molde puede combinarse con el dominio variable de cadena α de

5 TCR, cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37, para formar la molécula de TCR monocatenario. Como alternativa, uno de los dominios variables de cadena α de TCR SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37 pueden combinarse con uno de los dominios variables de cadena β de TCR SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53 para formar la molécula de TCR monocatenario. En la presente divulgación, las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β de la molécula de TCR monocatenario de alta afinidad se seleccionan preferentemente de la siguiente Tabla 2:

10

Tabla 2

Numeración de TCR	Secuencia de dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia de dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
s-1	9	4
s-2	10	38
s-3	11	38
s-4	11	39
s-5	11	40
s-6	12	41
s-7	13	41
s-8	14	38
s-9	15	42
s-10	16	41
s-11	17	40
s-12	3	43
s-13	3	44
s-14	3	45
s-15	3	46
s-16	3	47
s-17	3	48
s-18	3	49
s-19	18	4
s-20	19	4
s-21	20	4
s-22	21	4
s-23	22	4
s-24	23	4
s-25	24	4
s-26	25	4
s-27	26	4
s-28	27	4
s-29	28	4
s-30	29	4
s-31	30	4
s-32	31	4
s-33	32	4
s-34	33	4
s-35	34	4
s-36	10	4
s-37	14	4
s-38	35	4
s-39	36	4
s-40	37	4
s-41	3	50
s-42	3	51
s-43	3	52
s-44	3	53

15

El TCR de la presente divulgación puede proporcionarse en forma de complejo multivalente. El complejo de TCR multivalente de la presente divulgación comprende un polímero formado combinando dos, tres, cuatro o más TCR de la presente divulgación, por ejemplo, puede usarse un dominio tetramérico de p53 para producir un tetrámero. Como alternativa, pueden combinarse más TCR de la divulgación con otra molécula para formar un complejo. Los complejos de TCR de la divulgación pueden usarse para rastrear o dirigirse a células que presentan un antígeno *in vitro* o *in vivo* particular, o producir intermedios de otros complejos de TCR multivalentes con dichos usos.

El TCR de la presente divulgación puede usarse solo o combinado con un conjugado de manera covalente o de otra manera, preferentemente de manera covalente. El conjugado incluye un marcador detectable (con fines de diagnóstico, en donde el TCR se usa para detectar la presencia de una célula que presenta el complejo SLLMWITQC-HLA-A2), un agente terapéutico, un resto modificador de PK (proteína cinasa, por sus siglas en inglés),
5 o una combinación de cualquiera de las sustancias descritas anteriormente.

Los marcadores detectables con fines de diagnóstico incluyen, pero sin limitación, marcadores fluorescentes o luminiscentes, marcadores radiactivos, agentes de contraste para IRM (formación de imágenes por resonancia magnética) o TC (tomografía computarizada de electrones), o enzimas capaces de producir productos detectables.
10

Los agentes terapéuticos que pueden combinarse o acoplarse a los TCR de la divulgación incluyen, pero sin limitación: 1. *Radionuclides* (Koppe *et al.*, 2005, *Cancer metastasis reviews* 24, 539); 2. *Biotoxin* (Chaudhary *et al.*, 1989, *Nature* 339, 394; Epel *et al.*, 2002, *Cancer Immunology and Immunotherapy* 51, 565); 3. Citocinas, tales como IL-2, etc. (Gillies *et al.*, 1992, *National Academy of Sciences (PNAS)* 89, 1428; Card *et al.*, 2004, *Cancer Immunology and Immunotherapy* 53, 345; Halin *et al.*, 2003, *Cancer Research* 63, 3202); 4. Fragmento Fc de anticuerpo (Mosquera *et al.*, 2005, *The Journal Of Immunology* 174, 4381); 5. Fragmentos scFv de anticuerpo (Zhu *et al.*, 1995, *International Journal of Cancer* 62, 319); 6. Nanopartículas / Nanobarras de oro (Lapotko *et al.*, 2005, *Cancer letters* 239, 36; Huang *et al.*, 2006, *Journal of the American Chemical Society* 128, 2115); 7. Partículas víricas (Peng *et al.*, 2004, *Gene therapy* 11, 1234); 8. Liposomas (Mamot *et al.*, 2005, *Cancer research* 65, 11631); 9. Partículas nanomagnéticas; 10. Enzimas activadoras de profármacos (por ejemplo, DT-diaforasa (DTD) o proteína similar a bifenil hidrolasa (BPHL)); 11. agente quimioterápico (por ejemplo, cisplatino) o cualquier forma de nanopartículas y similares.
15
20

Un anticuerpo al que se une el TCR de la presente divulgación o un fragmento del mismo incluye un anticuerpo anti-linfocitos T o determinante de linfocitos NK, tal como un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28 o anti-CD16, y el anticuerpo anterior o un fragmento del mismo se une a un TCR, dirigiendo de este modo mejor las células efectoras a las células diana. En algunos aspectos, el TCR de la divulgación se une a un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento funcional o variante del mismo. Específicamente, una molécula de fusión del TCR de la presente divulgación y un anticuerpo monocatenario anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena α de TCR, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y un dominio variable de cadena β de TCR, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102.
25
30
35

La divulgación también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el TCR de la divulgación. La molécula de ácido nucleico de la divulgación puede estar en forma de ADN o ARN. El ADN puede ser una cadena codificante o una cadena no codificante. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR de la divulgación puede ser la misma que la secuencia de ácido nucleico expuesta en las Figuras de la divulgación o una variante degenerada de la misma. A modo de ejemplo, "variante degenerada", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína con una secuencia de la SEQ ID NO: 54, pero que tiene diferencias de la secuencia de la SEQ ID NO: 55.
40

La secuencia de longitud completa de la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación o un fragmento de la misma puede obtenerse generalmente mediante, pero sin limitación, amplificación por PCR, métodos recombinantes o métodos de síntesis. En la actualidad, ha sido posible obtener una secuencia de ADN que codifica el TCR (o un fragmento del mismo, o un derivado del mismo) de la presente divulgación totalmente mediante síntesis química. Y después la secuencia de ADN puede introducirse en diversas moléculas (o vectores) de ADN y células existentes conocidas en la técnica.
45
50

La divulgación también se refiere a vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la divulgación, así como células hospedadoras genéticamente modificadas usando los vectores o secuencias codificantes de la divulgación.

La divulgación también abarca células aisladas, en particular linfocitos T, que expresan el TCR de la divulgación. Existen diversos métodos adecuados para la transfección de linfocitos T con ADN o ARN que codifica el TCR de alta afinidad de la divulgación (por ejemplo, Robbins *et al.*, (2008) *J. Immunol.* 180: 6116-6131). Los linfocitos T que expresan el TCR de alta afinidad de la divulgación pueden usarse en inmunoterapia adoptiva. Un experto en la materia puede conocer muchos métodos adecuados para realizar terapia adoptiva (por ejemplo, Rosenberg *et al.*, (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4): 299-308).
55
60

La divulgación también proporciona una composición farmacéutica, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un TCR de la divulgación, o un complejo de TCR de la divulgación, o células que presentan el TCR de la divulgación.
65

La divulgación también proporciona un TCR para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, que

comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad adecuada de un TCR de la divulgación, o un complejo de TCR de la divulgación, o células que presentan un TCR de la divulgación, o una composición farmacéutica de la divulgación.

5 Debe entenderse que los nombres de aminoácidos mencionados en el presente documento se identifican mediante letras inglesas únicas aceptadas internacionalmente, y los nombres abreviados de tres letras correspondientes de un aminoácido son: Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu (E), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y), Val (V);

10 En la presente divulgación, tanto Pro60 como 60P representan prolina en la posición 60. Además, con respecto a la expresión de la forma específica de la mutación en la presente divulgación, tal como "T27G", representa que esa T en la 27.^a posición se sustituye por G. De manera similar, "I29A/V" significa que I en la 29.^a posición se sustituye por A o se sustituye por V, y así sucesivamente.

15 En la técnica, cuando se usa un aminoácido con propiedades similares para la sustitución, la función de la proteína por lo general no se ve alterada. La adición de uno o varios aminoácidos en el extremo C y/o el extremo N generalmente no altera la estructura y función de la proteína. Por lo tanto, el TCR de la divulgación incluye además un TCR, en donde hasta 5, preferentemente hasta 3, más preferentemente hasta 2, mucho más preferentemente 1 aminoácido (especialmente un aminoácido ubicado fuera de las regiones CDR) del TCR de la divulgación se reemplaza por un aminoácido con propiedades similares y aún puede mantener su función.

20 La presente divulgación también incluye un TCR obtenido a partir del TCR de la presente divulgación mediante ligera modificación. La forma de modificación (por lo general sin alterar la estructura primaria) incluye: formas derivadas químicamente del TCR de la divulgación, tales como acetilación o carboxilación. Las modificaciones también incluyen glicosilación, tales como aquellos TCR producidos mediante modificaciones de glicosilación en la síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales del TCR de la divulgación. Dicha modificación puede lograrse exponiendo el TCR a una enzima que realiza la glicosilación (tal como una enzima de glicosilación de mamífero o una enzima de desglucosilación). Las formas de modificación también incluyen secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados (tales como fosfotirosina, fosfoserina, fosfotreonina). También se incluyen TCR que se han modificado para potenciar sus propiedades antiproteolíticas u optimizar sus propiedades de solubilidad.

25 El TCR, los complejos de TCR de la divulgación o los linfocitos T transfectados por los TCR de la divulgación pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El TCR, el complejo de TCR multivalente o célula de la divulgación se proporciona normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril, que normalmente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser de cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado para la administración a un paciente). Puede proporcionarse en una forma farmacéutica unitaria, por lo general en un recipiente sellado, y puede proporcionarse como parte de un kit. Dicho kit incluye (pero no obligatoriamente) instrucciones. Puede incluir una pluralidad de dicha forma farmacéutica unitaria.

40 Además, el TCR de la divulgación puede usarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos (por ejemplo, formulados en la misma composición farmacéutica).

45 La composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico. La expresión se refiere a aquellos vehículos farmacéuticos que por sí mismos no inducen la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y que no son excesivamente tóxicos después de la administración. Estos vehículos son bien conocidos por un experto en la materia. Puede encontrarse un análisis completo de los excipientes farmacéuticamente aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., N. J. 1991). Dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, solución salina, tampón, dextrosa, agua, glicerol, etanol, adyuvantes y combinaciones de los mismos.

50 El vehículo farmacéuticamente aceptable en la composición terapéutica puede contener un líquido tal como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en estos vehículos también puede haber presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares.

55 En general, las composiciones terapéuticas pueden formularse como inyectables, tales como soluciones o suspensiones líquidas; y formas sólidas tales como vehículos líquidos, que pueden ser adecuadas para formularse en solución o suspensión antes de la inyección.

60 Una vez formulada una composición de la divulgación, puede administrarse por vías convencionales, incluyendo, pero sin limitación, administración intraocular, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica o tópica, preferentemente administración parenteral, incluyendo subcutánea, intramuscular o intravenosa. Un sujeto en el que se ha de realizar la prevención o el tratamiento puede ser un animal; especialmente un ser humano.

65 Cuando la composición farmacéutica de la presente divulgación se usa para el tratamiento real, pueden emplearse

composiciones farmacéuticas de diversas formas farmacéuticas dependiendo de los usos, preferentemente, una inyección, una preparación oral o similares.

5 Estas composiciones farmacéuticas pueden formularse mezclando, diluyendo o disolviendo de acuerdo con métodos convencionales, ocasionalmente, pueden añadirse aditivos farmacéuticos adecuados, tales como excipientes, agentes disgregantes, aglutinantes, lubricantes, diluyentes, tampones, agentes de isotonicidad, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes dispersantes, estabilizantes y cosolventes, y el proceso de formulación puede realizarse de manera habitual dependiendo de la forma farmacéutica.

10 La composición farmacéutica de la presente divulgación también puede administrarse en forma de una preparación de liberación sostenida. Por ejemplo, el TCR de la presente divulgación se puede incorporar en una píldora o microcápsula en la que el polímero de liberación sostenida se usa como vehículo, y después la píldora o microcápsula se implanta quirúrgicamente en el tejido que se ha de tratar. Los ejemplos del polímero de liberación sostenida incluyen copolímero de etileno-acetato de vinilo, polihidrometacrilato, poli(acrilamida), polivinilpirrolidona,
15 metilcelulosa, polímero de ácido láctico, copolímero de ácido láctico-ácido glicólico o similares, preferentemente polímero biodegradable, tal como polímero de ácido láctico y copolímero de ácido láctico-ácido glicólico.

20 Cuando la composición farmacéutica de la presente divulgación se usa para el tratamiento real, la cantidad del TCR o complejo de TCR de la presente divulgación o la célula que presenta el TCR de la presente divulgación como principio activo puede determinarse razonablemente basándose en el peso corporal, la edad, el sexo y el grado de síntomas de cada paciente que ha de tratarse, y en última instancia por un médico.

Ventajas principales:

- 25 (1) La afinidad y/o la semivida de unión del TCR de la presente divulgación para el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 es al menos 2 veces, preferentemente al menos 10 veces la de un TCR de tipo silvestre.
(2) La afinidad y/o la semivida de unión del TCR de la presente divulgación para el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 es al menos 100 veces, preferentemente al menos 1000 veces, y más preferentemente hasta 10^4 - 10^7 veces la de un TCR de tipo silvestre.
30 (3) Las células efectoras transducidas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación presenten un fuerte efecto letal sobre las células diana.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos. Ha de entenderse que estos ejemplos tienen fines meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación. Los métodos experimentales de los siguientes ejemplos que no especifican las condiciones específicas se realizan por lo general en condiciones convencionales, por ejemplo, condiciones descritas en Sambrook y Russell *et al.*, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (tercera edición) (2001) CSHL Publishing Company, o de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Los porcentajes y partes son en peso a menos que se indique otra cosa.

40 Materiales y método

Los materiales experimentales utilizados en los ejemplos de la presente divulgación pueden estar disponibles en el mercado, a menos que se especifique otra cosa, entre los cuales *E. coli* DH5a se adquirió en Tiangen, *E. coli* BL21 (DE3) se adquirió en Tiangen, *E. coli* Tuner (DE3) se adquirió en Novagen y el plásmido pET28a se adquirió en
45 Novagen.

Ejemplo 1. Generación de cadenas molde de TCR monocatenario estables con mutaciones en el núcleo hidrófobo

50 En la presente divulgación, se usó un método de mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con una bibliografía de patente WO2014/206304 para construir una molécula de TCR monocatenario estable que consiste en un dominio variable de cadena α y β de TCR conectado por un péptido corto flexible, y cuyas secuencias de aminoácidos y ADN son la SEQ ID NO: 54 y la SEQ ID NO: 55, respectivamente, como se muestra en las Figuras 7a y 7b. La molécula de TCR monocatenario se usó como molde para cribar moléculas de TCR de alta afinidad. Las secuencias de aminoácidos del dominio variable α (SEQ ID NO: 3) y el dominio variable β (SEQ ID NO: 4) de la cadena molde se muestran en las Figuras 2a y 2b; las secuencias de ADN correspondientes son las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente, como se muestra en las Figuras 3a y 3b; y la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN del enlazador corto flexible son las SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, como se muestra en las Figuras 4a y 4b.

60 El gen diana que porta la cadena molde se digirió con NcoI y NotI, y se ligó con el vector pET28a digerido con NcoI y NotI. El producto de ligadura se transformó en *E. coli* DH5 α , sembrado en una placa LB que contenía kanamicina, se invirtió y se cultivó a 37 °C durante la noche, y los clones positivos se seleccionaron para el cribado por PCR. Se secuenciaron recombinantes positivos para determinar la secuencia correcta y el plásmido recombinante se extrajo y se transfirió a *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión.

65

Ejemplo 2. Expresión, renaturalización y purificación del TCR monocatenario estable construido en el Ejemplo 1.

Todas las colonias de BL21(DE 3) que contenían el plásmido recombinante pET28a-cadena molde preparado en el Ejemplo 1 se inocularon en medio LB que contenía kanamicina y se cultivaron a 37 °C hasta que la DO₆₀₀ fue de 0,6-0,8. Se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y la mezcla se cultivó a 37 °C durante otras 4 horas. Los sedimentos celulares se recogieron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos y los sedimentos celulares se lisaron con Bugbuster Master Mix (Merck). Los cuerpos de inclusión se recuperaron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 min, seguido de lavado con Bugbuster (Merck) para eliminar los residuos celulares y la fracción de membrana. Los cuerpos de inclusión se recogieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos y se disolvieron en un tampón (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, urea 8 M), y las materias insolubles se eliminaron mediante centrifugación a alta velocidad. El sobrenadante se determinó cuantitativamente mediante el método de BCA y después se dispensó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

A 5 mg de proteína de cuerpo de inclusión de TCR monocatenario disuelta se le añadieron 2,5 ml de tampón (Gua-HCl 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM), después se añadió DTT a una concentración final de 10 mM y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Los TCR monocatenarios tratados anteriormente se añadieron gota a gota a 125 ml de tampón de plegamiento (Tris-HCl 100 mM, pH 8,1, L-arginina 0,4 M, urea 5 M, EDTA 2 mM, β-mercaptoetilamina 6,5 mM, Cistamina 1,87 mM) con una jeringa y la mezcla se agitó a 4 °C durante 10 min. Después, la solución plegada se cargó en una bolsa de diálisis con membrana de celulosa con un límite de 4 kDa, y la bolsa de diálisis se colocó en 1 litro de agua preenfriada y se agitó lentamente a 4 °C durante la noche. Después de 17 horas, el líquido de diálisis se cambió por 1 l de tampón previamente enfriado (Tris-HCl 20 mM pH 8,0) y la diálisis continuó durante 8 h a 4 °C. Después, el líquido de diálisis se reemplazó con el mismo tampón nuevo y la diálisis continuó durante la noche. Después de 17 horas, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,45 μm, se desgasificó al vacío y se purificó a través de una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, GE Healthcare) con una elución en gradiente lineal de NaCl 0-1 M preparado con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Las fracciones recogidas se sometieron a análisis por SDS-PAGE y las fracciones que contenían TCR monocatenarios se concentraron y se purificaron adicionalmente mediante una columna de filtración en gel (Superdex 75 10/300, GE Healthcare) y los componentes diana también se sometieron a análisis por SDS-PAGE.

Se analizó adicionalmente la pureza de las fracciones eluidas para el análisis BIAcore usando filtración en gel. Las condiciones fueron las siguientes: columna cromatográfica Agilent Bio SEC-3 (300 Å, φ 7,8×300 mm), fase móvil, tampón fosfato 150 mM, caudal 0,5 ml/min, temperatura de la columna 25 °C y longitud de onda de detección UV 214 nm.

Ejemplo 3. Caracterización de la unión

Análisis BIAcore

La actividad de unión de la molécula de TCR al complejo SLLMWITQC-HLA-A2 se detectó usando el sistema de análisis en tiempo real BIAcore T200. El anticuerpo anti-estreptavidina (GenScript) se añadió a un tampón de acoplamiento (tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 4,77), y después el anticuerpo se hizo pasar a través de un chip CM5 preactivado con EDC y NHS para inmovilizar el anticuerpo sobre la superficie del chip. La superficie activada sin reaccionar por último se bloqueó con una solución de etanolamina en ácido clorhídrico para completar el proceso de acoplamiento a un nivel de acoplamiento de aproximadamente 15.000 UR.

Una concentración baja de estreptavidina fluyó sobre la superficie del chip recubierto con anticuerpo, después, el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 fluyó a través del canal de detección y se usó otro canal como canal de referencia. Biotina 0,05 mM fluyó sobre el chip durante 2 min a un caudal de 10 μl/min, bloqueando de este modo los sitios de unión restantes para la estreptavidina. La afinidad se determinó mediante análisis cinético de ciclo único. El TCR se diluyó a varias concentraciones diferentes con tampón HEPES-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,005 %, pH 7,4) y fluyó sobre la superficie del chip a su vez a un caudal de 30 μl/min, con un tiempo de unión de 120 s por inyección. Después de la última inyección, el chip se colocó para disociación durante 600 s. Al final de cada ronda de ensayo, el chip se regeneró con Gly-HCl 10 mM, pH 1,75. Los parámetros cinéticos se calcularon usando el software BIAcore Evaluation.

El proceso de preparación para el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 anterior se describe a continuación:

a. Purificación

Se recogieron 100 ml de líquido de *E. coli* inducido para expresar cadena pesada o ligera y se centrifugaron a 8000 g durante 10 min a 4 °C, y las células se lavaron una vez con 10 ml de PBS, y después se agitaron vigorosamente en 5 ml de reactivos de extracción BugBuster Master Mix (Merck) para resuspender las células. La suspensión se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 6000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó para recoger cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión anteriores se resuspendieron en 5 ml de BugBuster Master Mix y se incubaron

verticalmente a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 30 ml de BugBuster diluido 10 veces, se mezclaron y se centrifugaron a 6000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó, se añadieron 30 ml de BugBuster diluido en 10 veces para resuspender el cuerpo de inclusión, se mezclaron y se centrifugaron dos veces a 6000 g a 4 °C durante 15 min. Se añadieron 30 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, para resuspender los cuerpos de inclusión, se mezclaron y se centrifugaron a 6000 g a 4 °C durante 15 min. Por último, los cuerpos de inclusión se disolvieron en Tris-HCl 20 mM, urea 8 M, y la pureza de los cuerpos de inclusión se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió con el kit BCA.

b. Replegamiento

El péptido corto sintetizado SLLMWITQC (Beijing Saibaisheng Gene Technology Co., Ltd.) se disolvió en DMSO a una concentración de 20 mg/ml. Se solubilizaron cuerpos de inclusión de cadena ligera y pesada en urea 8 M, Tris 20 mM, pH 8,0, DTT 10 mM, y se desnaturalizaron adicionalmente añadiendo clorhidrato de guanidina 3 M, acetato de sodio 10 mM, EDTA 10 mM antes de replegar. El péptido SLLMWITQC se añadió a un tampón de replegamiento (L-arginina 0,4 M, Tris 100 mM pH 8,3, EDTA 2 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, glutatión reducido 5 mM, PMSF 0,2 mM, enfriado a 4 °C) a 25 mg/l (concentración final). Después se añadieron sucesivamente 20 mg/l de cadena ligera y 90 mg/l de cadena pesada (concentración final, la cadena pesada se añadió en tres porciones, 8 h/porción) y se replegaron a 4 °C durante al menos 3 días hasta completar el replegamiento, y se usó SDS-PAGE para confirmar el replegamiento.

c Purificación tras replegamiento

El tampón de replegamiento se reemplazó con 10 volúmenes de Tris 20 mM, pH 8,0 para diálisis, y el tampón se intercambiaba al menos dos veces para reducir sustancialmente la fuerza iónica de la solución. Después de la diálisis, la solución de proteína se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm y se cargó en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP (GE, General Electric Company) (5 ml de volumen de lecho). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-400 mM preparado en Tris 20 mM, pH 8,0 usando Akta Purifier (GE), y el pMHC se eluyó a NaCl aproximadamente 250 mM. Se recogieron las fracciones máximas y se detectó la pureza de las mismas mediante SDS-PAGE.

d. Biotinilación

Las moléculas de pMHC purificadas se concentraron en un tubo de ultrafiltración Millipore, mientras que el tampón se reemplazó con Tris 20 mM pH 8,0, y después se añadieron reactivo de biotinilación Bicine 0,05 M pH 8,3, ATP 10 mM, MgOAc 10 mM, D-Biotina 50 µM y enzima BirA (GST-BirA) 100 µg/ml. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante la noche y se usó SDS-PAGE para detectar la finalización de la biotinilación.

e. Purificación del complejo biotinilado

Las moléculas de pMHC biotiniladas y marcadas se concentraron a 1 ml en un tubo de ultrafiltración Millipore. El pMHC biotinilado se purificó mediante cromatografía de filtración en gel. Se cargó 1 ml de moléculas de pMHC biotiniladas concentradas en una columna HiPrep™ 16/60 S200 HR (GE) preequilibrada con PBS filtrado usando un purificador Akta (GE) y eluida con PBS a un caudal de 1 ml/min. Las moléculas de pMHC biotiniladas se eluyeron como un único pico a aproximadamente 55 ml. Las fracciones que contenían proteínas se combinaron y se concentraron en un tubo de ultrafiltración Millipore. La concentración de proteína se determinó mediante el método de BCA (Thermo), se añadió un cóctel inhibidor de proteasa (Roche) y las moléculas de pMHC biotiniladas se dispensaron y almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 4. Generación de TCR monocatenario de alta afinidad

La tecnología de presentación en fagos es un medio para generar bibliotecas de variantes de TCR de alta afinidad para cribar variantes de alta afinidad. El método de cribado y presentación en fagos de TCR descrito por Li *et al.* ((2005) *Nature Biotech* 23(3): 349-354) se aplicó al molde de TCR monocatenario del Ejemplo 1. Se estableció una biblioteca de TCR de alta afinidad mutando regiones CDR de la cadena de molde y se analizaron. Después de varias rondas de análisis, la biblioteca de fagos puede unirse específicamente al antígeno correspondiente, se seleccionó el monoclon y se realizó el análisis de secuencia.

Se usó el método BIAcore del Ejemplo 3 para analizar la interacción entre una molécula de TCR y el complejo SLLMWITQC-HLA-A2, y se separó por cribado un TCR de alta afinidad con afinidad y/o semivida de unión de al menos 2 veces la del TCR de tipo silvestre, es decir, la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR de alta afinidad cribado para la unión al complejo SLLMWITQC-HLA-A2 es menor o igual a la mitad de la constante de equilibrio de disociación K_D del TCR de tipo silvestre para la unión al complejo SLLMWITQC-HLA-A2, y los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación. Se detectó que el valor de K_D de la interacción entre el TCR de referencia y el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 era de 43 µM usando el método anterior, y la curva de interacción se muestra en la Fig. 12, es decir, el valor de K_D del TCR de tipo silvestre que interactúa con el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 también es de 43 µM (4,3E-05 M).

ES 2 985 766 T3

5 Específicamente, cuando se usa la numeración que se muestra en la SEQ ID NO: 1, mutó un aminoácido en uno o más de entre los siguientes sitios en el dominio variable de cadena α de estos mutantes de TCR de alta afinidad: 27T, 28S, 29I, 30N, 51S, 52N, 53E, 54R, 90A, 91T, 93A, 94N, 95G, 96K, 97I y 98I y/o cuando se usa la numeración que se muestra en la SEQ ID NO: 41, mutó un aminoácido en uno o más de los siguientes sitios en el dominio variable de cadena β de estos mutantes de TCR de alta afinidad: S1N, 52N, 53V, 54P, 95S, 96L y 98S.

10 Más específicamente, cuando se usa la numeración que se muestra en la SEQ ID NO: 1, los dominios variables de cadena α de estos TCR de alta afinidad comprenden uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 27G, 28W, 29A o 29V, 30Q, 51T, 52G, 53Q, 54Q o 54A, 90M, 91Y, 93E o 93Q, 94F o 94Y o 94W, 95A o 95Q, 96W o 96R o 96T o 96S o 96M o 96L, 97W o 97V o 97Y o 97P, y 98E o 98N o 98D o 98Q o 98K o 98V o 98G o 98M o 98S; y/o cuando se usa la numeración que se muestra en la SEQ ID NO: 2, los dominios variables de cadena β de estos TCR de alta afinidad comprenden uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 51H, 52G, 53A, 54V, 95Q o 95M, 96R o 96K o 96M y 98A o 98G o 98P.

15 Las secuencias de aminoácidos específicas de los dominios variables de la cadena α (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37) y los dominios variables de cadena β (SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53) de los TCR monocatenarios de alta afinidad se muestran en las Figuras 5(1)-(29) y las Figuras 6(1)-(16), respectivamente.

20

Tabla 3

Numeración de TCR monocatenario	Dominio variable de TCR monocatenario (SEQ ID NO.)		K _D (M)
	α	β	
s-1	9	4	2,97E-09
s-2	10	38	2,66E-10
s-3	11	38	2,78E-10
s-4	11	39	4,75E-10
s-5	11	40	3,57E-10
s-6	12	41	3,42E-10
s-7	13	41	2,95E-10
s-8	14	38	3,41E-10
s-9	15	42	3,17E-10
s-10	16	41	4,25E-10
s-11	17	40	5,72E-10
s-12	3	43	3,80E-07
s-13	3	44	1,58E-06
s-14	3	45	4,91E-06
s-15	3	46	8,51E-07
s-16	3	47	1,69E-06
s-17	3	48	1,01E-07
s-18	3	49	1,57E-07
s-19	18	4	4,73E-06
s-20	19	4	3,33E-07
s-21	20	4	1,08E-07
s-22	21	4	1,54E-07
s-23	22	4	3,25E-07
s-24	23	4	2,79E-07
s-25	24	4	1,97E-07
s-26	25	4	1,06E-07
s-27	26	4	1,09E-06
s-28	27	4	3,96E-07
s-29	28	4	1,27E-06
s-30	29	4	1,04E-06
s-31	30	4	1,31E-06
s-32	31	4	4,71E-10
s-33	32	4	3,14E-10
s-34	33	4	7,16E-10
s-35	34	4	5,11E-10
s-36	10	4	8,43E-10
s-37	14	4	8,55E-10
s-38	35	4	9,43E-10
s-39	36	4	1,08E-09
s-40	37	4	1,11E-09

(continuación)

Numeración de TCR monocatenario	Dominio variable de TCR monocatenario (SEQ ID NO.)		K _D (M)
	α	β	
s-41	3	50	5,21E-08
s-42	3	51	7,60E-08
s-43	3	52	9,39E-08
s-44	3	53	6,68E-08

Ejemplo 5. Generación de TCR heterodimérico αβ de alta afinidad

5 Las mutaciones en las regiones CDR de los TCR monocatenarios de alta afinidad seleccionados en el Ejemplo 4 se introdujeron en los sitios correspondientes del dominio variable del TCR heterodimérico αβ, y su afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 se detectó mediante BIAcore. Los sitios mutados de alta afinidad pueden introducirse en las regiones CDR anteriores mediante un método de mutagénesis dirigida al sitio bien conocido por un experto en la materia. Las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena α y cadena β del TCR de tipo silvestre anterior se muestran en las Figuras 1a (SEQ ID NO: 1) y 1b (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

10 Cabe señalar que con el fin de obtener un TCR soluble más estable para una evaluación más sencilla de la afinidad de unión y/o la semivida de unión entre el TCR y el complejo SLLMWITQC-HLA A2, el TCR heterodimérico αβ puede ser un TCR en el que un resto cisteína se introduce respectivamente en el dominio constante de cadena α y β para formar un enlace disulfuro intercatenario artificial. En este ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las cadenas α y β de TCR después de introducir un resto cisteína se muestran en la Figura 8a (SEQ ID NO: 56) y 8b (SEQ ID NO: 57), y los restos cisteína introducidos se indican con letras en negrita.

15 De acuerdo con los métodos convencionales descritos en *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (3.^a edición, Sambrook y Russell), se sintetizan genes de secuencias extracelulares de las cadenas α y β de TCR que se han de expresar y se insertan en un vector de expresión pET28a+ (Novagene), en el que los sitios de clonación en dirección 5' y en dirección 3' son NcoI y NotI, respectivamente. Las mutaciones en las regiones CDR se introducen mediante PCR de superposición bien conocida por un experto en la materia. El fragmento insertado se secuenció para confirmar que era correcto.

25

Ejemplo 6. Expresión, replegamiento y purificación de TCR heterodimérico αβ

Los vectores de expresión para las cadenas α y β de TCR se transformaron en la bacteria de expresión BL21 (DE3) mediante transformación química, respectivamente. Las bacterias se cultivaron en medio LB y se indujeron con una concentración final de IPTG 0,5 mM a DO₆₀₀ = 0,6. Los cuerpos de inclusión formados después de que se expresasen las cadenas α y β de TCR se extrajeron con BugBuster Mix (Novagene) y se lavaron repetidamente con solución BugBuster. Los cuerpos de inclusión por último se disolvieron en clorhidrato de guanidina 6 M, ditiotreitól 10 mM (DTT), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM y Tris 20 mM (pH 8,1).

35 Las cadenas α y β de TCR disueltas se mezclaron rápidamente en urea 5 M, arginina 0,4 M, Tris 20 mM (pH 8,1), cistamina 3,7 mM y β-mercaptoetilamina 6,6 mM (4 °C) a una relación en masa de 1:1. La concentración final es de 60 mg/ml. Después de la mezcla, la solución se dializó frente a 10 volúmenes de agua desionizada (4 °C), y después de 12 horas, se intercambiaba agua desionizada con un tampón (Tris 20 mM, pH 8,0) y la diálisis continuó a 4 °C durante 12 horas. Una vez finalizada la diálisis, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 μM y se purificó a través de una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 5 ml, GE Healthcare). El pico de elución del TCR que contenía dímeros α y β replegados satisfactoriamente se confirmó mediante gel de SDS-PAGE. Después, el TCR se purificó adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel (HiPrep 16/60, Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare). Se determinó que la pureza del TCR purificado mediante SDS-PAGE era superior al 90 %, y la concentración del mismo se determinó mediante el método de BCA.

45

Ejemplo 7. Resultados del análisis por BIAcore

La afinidad del TCR heterodimérico αβ, en el que se introdujo una región CDR de alta afinidad, para el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 se detectó mediante el uso del método descrito en el Ejemplo 3.

50

Las regiones CDR seleccionadas de las cadenas α y β de TCR monocatenario de alta afinidad se transfirieron a las posiciones correspondientes del dominio variable de cadena α de TCR de tipo silvestre SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2, respectivamente, para formar un TCR heterodimérico αβ. Las secuencias de aminoácidos de los nuevos dominios variables de cadena α y β de TCR resultantes se muestran en las Figuras 9(1)-(29) y las Figuras 10(1)-(16), respectivamente. Puesto que las regiones CDR de una molécula de TCR determinan su afinidad por el complejo pMHC correspondiente, un experto en la materia puede anticipar que un TCR heterodimérico αβ, en el que se introduce un sitio de mutación de alta afinidad también tiene una alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2. El vector de expresión se construyó mediante el método descrito en el Ejemplo 5, el TCR heterodimérico αβ mencionado anteriormente con una mutación de alta afinidad que se está introduciendo se

55

expresó, se replegó y se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo 6, y después se determinó la afinidad del TCR por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 mediante BIAcore T200, como se muestra en la Tabla 4 a continuación.

5

Tabla 4

Numeración de TCR	Dominio variable de TCR (SEQ ID NO)		K _D (M)
	α	β	
1	58	2	2,90E-10
2	59	87	1,10E-11
3	60	87	1,13E-11
4	60	88	1,43E-11
5	60	89	1,35E-11
6	61	90	1,19E-11
7	62	90	6,63E-12
8	63	87	8,77E-12
9	64	91	8,41E-12
10	65	90	6,05E-12
11	66	89	9,70E-12
12	1	92	2,13E-06
13	1	93	1,72E-06
14	1	94	1,02E-06
15	1	95	1,04E-06
16	1	96	1,60E-06
17	1	97	3,01E-07
18	1	98	1,33E-07
19	67	2	9,69E-07
20	68	2	2,24E-05
21	69	2	3,26E-08
22	70	2	1,12E-07
23	71	2	3,57E-07
24	72	2	1,54E-07
25	73	2	3,10E-07
26	74	2	1,15E-07
27	75	2	5,69E-07
28	76	2	2,97E-07
29	77	2	5,90E-07
30	78	2	4,37E-07
31	79	2	6,86E-07
32	80	2	2,57E-11
33	81	2	3,80E-11
34	82	2	2,17E-11
35	83	2	4,55E-11
36	59	2	3,55E-11
37	63	2	3,03E-11
38	84	2	3,29E-11
39	85	2	5,70E-11
40	86	2	1,13E-10
41	1	99	1,59E-06
42	1	100	2,43E-06
43	1	101	1,04E-06
44	1	102	7,02E-06

Como puede observarse a partir de la Tabla 4, el TCR heterodimérico αβ con sitios de mutación introducidos en regiones CDR mantiene una alta afinidad por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2. La afinidad del TCR heterodimérico por el complejo SLLMWITQC-HLA-A2 es al menos 2 veces la del TCR de tipo silvestre.

10

Ejemplo 8. Expresión, replegamiento y purificación de fusiones de anticuerpos anti-CD3 con TCR monocatenario de alta afinidad

15

La molécula de TCR monocatenario de alta afinidad de la presente divulgación se fusiona con una molécula monocatenaria (scFv) de un anticuerpo anti-CD3 para construir una molécula de fusión. Se diseñaron cebadores mediante PCR de superposición y los genes de los anticuerpos anti-CD3 y la molécula de TCR monocatenario de alta afinidad se ligaron. El enlazador intermedio se diseñó como GGGGS y el fragmento génico de la molécula de fusión tenía sitios de enzimas de restricción NcoI y NotI. El producto de amplificación por PCR se digirió con NcoI y

NotI y se ligó con el vector pET28a digerido con NcoI y NotI. El producto de ligadura se transformó en células competentes de *E. coli* DH5a y se sembraron en placas de LB que contenían kanamicina y se invirtieron y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se seleccionaron clones positivos para el cribado por PCR y los recombinantes positivos se secuenciaron para determinar la secuencia correcta. Los plásmidos recombinantes se extrajeron y se transformaron en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión.

Expresión de proteína de fusión

El plásmido de expresión que contenía el gen de interés se transformó en *E. coli* cepa BL21 (DE3), se sembró en una placa de LB (kanamicina, 50 µg/ml) y se cultivó a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, los clones se seleccionaron y se inocularon en 10 ml de medio líquido LB (kanamicina, 50 µg/ml), se cultivaron durante 2-3 h, después se inocularon en 1 litro de medio LB (kanamicina, 50 µg/ml) a una relación en volumen de 1:100, se cultivaron hasta que la DO₆₀₀ fue de 0,5-0,8 y después se indujeron a expresar la proteína de interés usando IPTG a una concentración final de 0,5 mM. 4 horas después de la inducción, las células se recogieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Las células se lavaron una vez en tampón de PBS y se dispensaron. Se tomaron células correspondientes a 200 ml del cultivo bacteriano y se lisaron con 5 ml de BugBuster Master Mix (Novagen), y los cuerpos de inclusión se recogieron mediante centrifugación a 6000 g durante 15 minutos. Los cuerpos de inclusión se lavaron 4 veces con detergente para eliminar los residuos celulares y los componentes de la membrana. Después, los cuerpos de inclusión se lavaron con un tampón tal como PBS para eliminar el detergente y la sal. Por último, los cuerpos de inclusión se disolvieron en una solución tampón de Tris que contenía urea 8 M, la concentración de los cuerpos de inclusión se midió y los cuerpos de inclusión se dispensaron y crioconservaron a -80 °C.

Replegamiento de proteínas de fusión

Se tomaron aproximadamente 10 mg de cuerpos de inclusión de un congelador a temperatura ultrabaja de -80 °C y se descongelaron, e añadió ditioneitol (DTT) a una concentración final de 10 mM y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min a 1 hora para garantizar la apertura completa del enlace disulfuro. Después, la solución de la muestra de cuerpos de inclusión se añadió gota a gota a 200 ml de tampón de replegamiento preenfriado a 4 °C (Tris 100 mM, pH 8,1, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, urea 5 M, β-mercaptoetilamina 6,5 mM, Cistamina 1,87 mM), respectivamente, y se agitaron lentamente a 4 °C durante aproximadamente 30 minutos. La solución de replegamiento se dializó frente a 8 volúmenes de H₂O preenfriada durante 16-20 horas. Se dializó adicionalmente dos veces con 8 volúmenes de Tris 10 mM, pH 8,0, y la diálisis continuó a 4 °C durante aproximadamente 8 horas. Después de la diálisis, la muestra se filtró y se sometió al siguiente proceso de purificación.

Primera etapa de purificación de la proteína de fusión

El material dializado y replegado (en Tris 10 mM, pH 8,0) se eluyó en una columna rellena previamente de cromatografía de intercambio aniónico POROS HQ/20 (Applied Biosystems) con un gradiente de NaCl 0-600 mM usando un purificador AKTA (GE Healthcare). Cada componente se analizó mediante SDS-PAGE teñida con azul brillante de Coomassie y después se combinó.

Segunda etapa de purificación de la proteína de fusión

La solución de muestra purificada y combinada de la primera etapa se concentró para la purificación en esta etapa, y la proteína de fusión se purificó mediante una columna rellena previamente de cromatografía de filtración en gel Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) preequilibrada en tampón de PBS. Los componentes de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie y después se combinaron.

50 Ejemplo 9. Expresión, replegamiento y purificación de fusiones de anticuerpo anti-CD3 con TCR heterodimérico αβ de alta afinidad

Se preparó una molécula de fusión fusionando un anticuerpo monocatenario anti-CD3 (scFv) con un TCR heterodimérico αβ. El scFv anti-CD3 se fusionó con la cadena β de TCR, y la cadena β de TCR puede comprender un dominio variable de cadena β de cualquiera de los TCR heterodiméricos αβ de alta afinidad anteriores, y la cadena α de TCR de la molécula de fusión puede comprender el dominio variable de cadena α de cualquiera de los TCR heterodiméricos αβ de alta afinidad anteriores.

Construcción de vector de expresión para molécula de fusión

1. Construcción de vector de expresión para cadena α

El gen diana que porta la cadena α del TCR heterodimérico αβ se digirió con NcoI y NotI, y se ligó con el vector pET28a digerido con NcoI y NotI. El producto de ligadura se transformó en *E. coli* DH5α, se sembró en una placa de LB que contenía kanamicina, se invirtió y se cultivó durante la noche a 37 °C. Se seleccionaron clones positivos para el cribado por PCR y los recombinantes positivos se secuenciaron para determinar la secuencia correcta. Los

plásmidos recombinantes se extrajeron y se transformaron en *E. coli* Tuner (DE3) para la expresión.

2. Construcción de vector de expresión para cadena β anti-CD3 (scFv)

5 Los cebadores se diseñaron mediante PCR de superposición para ligar el scFv anti-CD3 y el gen de la cadena TCR β heterodimérica de alta afinidad, el enlazador intermedio era GGGGS, y el fragmento génico de la proteína de fusión de scFv anti-CD3 y la cadena TCR β heterodimérica de alta afinidad tenía los sitios de endonucleasa de restricción NcoI (CCATGG) y NotI (GCGGCCGC). El producto de amplificación por PCR se digirió con NcoI y NotI y se ligó con el vector pET28a digerido con NcoI y NotI. El producto de ligadura se transformó en células competentes de *E. coli* DH5a, se sembró en una placa de LB que contenía kanamicina, se invirtió y se cultivó durante la noche a 37 °C. Se seleccionaron clones positivos para el cribado por PCR y los recombinantes positivos se secuenciaron para determinar la secuencia correcta. Los plásmidos recombinantes se extrajeron y se transformaron en células competentes de *E. coli* Tuner (DE3) para la expresión.

15 Expresión, replegamiento y purificación de proteína de fusión

Los plásmidos de expresión se transformaron por separado en células competentes de *E. coli* Tuner (DE3), se sembraron en placas de LB (kanamicina 50 μ g/ml) y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, los clones se recogieron y se inocularon en 10 ml de medio líquido LB (kanamicina 50 μ g/ml) durante 2-3 h y se inocularon en 1 l de medio LB a una relación en volumen de 1:100, el cultivo continuó hasta que la DO600 fue de 0,5-0,8 y se añadió una concentración final de IPTG 1 mM para inducir la expresión de la proteína de interés. Después de 4 horas, las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron una vez en tampón de PBS y se dispensaron, y se tomaron células correspondientes a 200 ml del cultivo bacteriano y se lisaron con 5 ml de BugBuster Master Mix (Merck), se recogieron cuerpos de inclusión mediante centrifugación a 6000 g durante 15 minutos y después se lavaron con detergente 4 veces para eliminar los residuos celulares y los componentes de membrana. Después, los cuerpos de inclusión se lavaron con un tampón tal como PBS para eliminar el detergente y la sal. Por último, los cuerpos de inclusión se disolvieron en clorhidrato de guanidina 6 M, ditiotreitól 10 mM (DTT), ácido etilendiaminotetraacético 10 mM (EDTA), Tris 20 mM, solución tampón pH 8,1 y se determinó la concentración de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se dispensaron y crioconservaron a -80 °C.

La cadena TCR α disuelta y el anti-CD3 (scFv)-cadena β se mezclaron rápidamente a una relación en masa de 2:5 en urea 5 M (urea), L-arginina 0,4 M (L-arginina), Tris 20 mM, pH 8,1, cistamina 3,7 mM y β -mercaptoetilamina 6,6 mM (4°C), y las concentraciones finales de cadena α y anti-CD3 (scFv)-cadena β fueron de 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, respectivamente.

Después de la mezcla, la solución se dializó frente a 10 volúmenes de agua desionizada (4 °C), y después de 12 horas, se intercambió agua desionizada con tampón (Tris 10 mM, pH 8,0) durante otras 12 horas a 4 °C. Después de completar la diálisis, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se purificó mediante una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP 5 ml, GE Healthcare). Los picos eluidos que contenían la cadena α de TCR reconstituida y el TCR de dímero anti-CD3 (scFv)-cadena β se confirmaron mediante gel de SDS-PAGE. Después, la molécula de fusión de TCR se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (S-100 16/60, GE Healthcare) y se purificó adicionalmente mediante una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP 5 ml, GE Healthcare). Se determinó que la pureza de la molécula de fusión de TCR purificada mediante SDS-PAGE era superior al 90 %, y la concentración se determinó mediante el método de BCA.

Ejemplo 10. Ensayo de función de activación de las células efectoras transfectadas con TCR de alta afinidad de la presente divulgación

50 Este ejemplo demuestra que las células efectoras transfectadas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación tienen un buen efecto de activación específica sobre las células diana.

La función y la especificidad del TCR de alta afinidad de la presente divulgación en células se examinaron mediante el ensayo ELISPOT. Los expertos en la materia conocen bien métodos para detectar la función celular usando ensayos ELISPOT. En el ensayo ELISPOT de IFN- γ de este ejemplo, se usaron linfocitos T CD8⁺ aislados de la sangre de voluntarios sanos y transfectadas con TCR usando lentivirus como células efectoras, y se marcaron como TCR1 (dominio variable de cadena α SEQ ID NO: 67, dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2) y TCR2 (dominio variable de cadena α SEQ ID NO: 68, dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2) respectivamente. En el grupo de control, las células efectoras se marcaron como WT-TCR (transfectadas con TCR de tipo silvestre) y GFP (transfectadas con GFP). Las estirpes celulares diana fueron células A375, Mel624, Mel526 y NCI-H1650, en las que las estirpes celulares diana A375 y Mel624 expresaron antígenos relacionados, y Mel526 y NCI-H1650, como controles, no expresaron antígenos relacionados.

65 En primer lugar, se preparó una placa de ELISPOT. La placa de ELISPOT se activó y se recubrió con etanol durante la noche a 4 °C. El primer día del experimento, la solución de recubrimiento se eliminó y la placa se lavó, se bloqueó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, y la solución de bloqueo se eliminó. Los componentes del

ensayo se añadieron a la placa de ELISPOT en el siguiente orden: el medio para ajustar las células efectoras a 1×10^5 células/ml y el medio para ajustar cada estirpe celular diana a 2×10^5 células/ml. Después de mezclar homogéneamente, se añadieron 100 μ l de estirpe celular diana 2×10^5 células/ml (es decir, 20.000 células/pocillo) y 100 μ l de células efectoras 1×10^5 células/ml (es decir, 10.000 células/pocillo) a los pocillos correspondientes por duplicado y se incubaron durante la noche (37 °C, CO₂ al 5 %). El segundo día del experimento, la placa se lavó, se sometió a una detección y un revelado secundarios, se secó y las manchas formadas en la película se contaron usando un lector de placas de inmunospot (sistema ELISPOT READER; empresa AID20). Los resultados experimentales se muestran en la Figura 13, en la que las células efectoras transfectadas con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación presentan excelentes efectos de activación específica sobre las células diana.

Ejemplo 11. Ensayo de función de destrucción de células efectoras transfectadas con TCR de alta afinidad de la presente divulgación

En este ejemplo, la liberación de LDH se determinó mediante un ensayo de citotoxicidad no radiactiva para verificar la función de destrucción de las células que transducen el TCR de la presente divulgación. El ensayo es un ensayo de sustitución colorimétrica para el ensayo de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr para cuantificar la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada después de la lisis celular. La LDH liberada en el medio se detectó usando una reacción enzimática acoplada de 30 minutos, en la que la LDH convierte la sal de tetrazolio (INT) en formazán rojo. La cantidad de producto rojo producido es directamente proporcional al número de células lisadas. Los datos de absorbancia de la luz visible a 490 nm pueden recopilarse usando un lector de placas convencional de 96 pocillos.

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para detectar la función celular usando el ensayo de liberación de LDH. En el experimento LDH de este ejemplo, como células efectoras se usaron células PBL aisladas de la sangre de voluntarios sanos transfectadas con TCR mediante lentivirus. Las estirpes celulares diana fueron células A375 (3525), MEL624 (1605), NCI-H1650 (2) y MEL526 (4), en las que, A375 (3525) y MEL624 (1605) expresaron el antígeno NY-ESO-1, y NCI-H1650(2) y MEL526(4), como controles, no expresaron sustancialmente el antígeno NY-ESO-1.

En primer lugar, se preparó una placa de LDH. El primer día del experimento, los componentes del ensayo se añadieron a la placa en el siguiente orden: el medio para ajustar las células efectoras a 2×10^6 células/ml y el medio para ajustar cada estirpe celular diana a 5×10^5 células/ml. Después de mezclar homogéneamente, se añadieron 100 μ l de estirpe celular diana 5×10^5 células/ml (es decir, 50.000 células/pocillo) y 100 μ l de células efectoras 2×10^6 células/ml (es decir, 200.000 células/pocillo) a los pocillos correspondientes por triplicado. Se configuraron simultáneamente pocillos para células efectoras espontáneas, para células diana espontáneas, para células diana máximas, para el control de volumen corregido y para el control de fondo de medio. La placa se incubó durante la noche (37 °C, CO₂ al 5 %). El segundo día del experimento, se detectó revelado de color y después de que terminase la reacción, la absorbancia a 490 nm se registró usando un lector de microplacas (Biotek). Los resultados del experimento se muestran en la Fig. 14, en la que las células transducidas con el TCR de la presente divulgación presentan fuertes efectos de destrucción sobre las células diana que expresan el antígeno relevante, pero no tienen efectos de destrucción sobre las células diana que no expresan el antígeno relevante.

Ejemplo 12. Ensayo funcional de proteína de fusión de TCR de alta afinidad de la presente divulgación y anticuerpo anti-CD3

Este ejemplo demuestra que la proteína de fusión del TCR de alta afinidad de la presente divulgación y anticuerpo anti-CD3 es capaz de redirigir células efectoras y presenta buenos efectos de activación.

Los expertos en la materia conocen bien métodos para detectar la función celular usando ensayos ELISPOT. Las células efectoras utilizadas en el ensayo ELISPOT de IFN- γ de este ejemplo fueron linfocitos T CD8+ aislados de la sangre de voluntarios sanos. Las estirpes celulares diana fueron IM9 y 293T, en donde IM9 expresó el antígeno relevante y 293T no expresó el antígeno relevante. El TCR de alta afinidad de la presente divulgación se seleccionó aleatoriamente y la proteína de fusión se preparó como se describe en el Ejemplo 8. Específicamente, las cadenas α y β del TCR de alta afinidad seleccionado fueron las siguientes: cadena α SEQ ID NO: 14, cadena β SEQ ID NO: 38; cadena α SEQ ID NO: 17, cadena β SEQ ID NO: 40; cadena α SEQ ID NO: 13, cadena β SEQ ID NO: 41; cadena α SEQ ID NO: 11, cadena β SEQ ID NO: 40; cadena α SEQ ID NO: 15, cadena β SEQ ID NO: 42; cadena α SEQ ID NO: 16, cadena β SEQ ID NO: 41; cadena α SEQ ID NO: 11, cadena β SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 11, cadena β SEQ ID NO: 39; cadena α SEQ ID NO: 10, cadena β SEQ ID NO: 38; y cadena α SEQ ID NO: 12, cadena β SEQ ID NO: 41.

En primer lugar, se preparó una placa de ELISPOT. La placa de ELISPOT se activó y se recubrió con etanol y se incubó durante la noche a 4 °C. El primer día del experimento, la solución de recubrimiento se eliminó y la placa se lavó, se bloqueó y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas, y la solución bloqueadora se eliminó. Los componentes del ensayo se añadieron a la placa de ELISPOT en el siguiente orden: medio para ajustar los linfocitos T CD8+ a 2×10^4 células/ml, medio para ajustar cada estirpe celular diana a 2×10^5 células/ml y medio para diluir la proteína de fusión a una concentración de 0,04 μ M (diluida en serie 10 veces, para un total de 6 gradientes de concentración). Después de mezclar homogéneamente, se tomaron 50 μ l de dilución de proteína de fusión, 50 μ l de

estirpe celular diana 2×10^5 células/ml (es decir, 10.000 células/pocillo) y 100 μ l de células efectoras 2×10^4 células/ml (es decir, 2.000 células efectoras/pocillo) y se añadieron a los pocillos correspondientes por duplicado. La placa se incubó durante la noche (37 °C, CO₂ al 5 %). El segundo día del experimento, la placa se lavó y se sometió a detección y revelado de color secundarios. La placa se secó y las manchas formadas en la película se contaron usando un lector de placas de inmunospot (sistema ELISPOT READER; empresa AID20). Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 15a y 15b, y la proteína de fusión del TCR de alta afinidad de la presente divulgación y anticuerpo anti-CD3 es capaz de redirigir las células efectoras y presenta buenos efectos de activación.

10 **Ejemplo 13. Eficacia *in vivo* de la molécula de TCR de alta afinidad de la divulgación**

Se inyectaron linfocitos T transfectados con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación en ratones de modelo de xenoinjerto de melanoma humano para someter a ensayo los efectos inhibidores de los mismos sobre tumores *in vivo*.

15 En el experimento, se usaron como sujetos experimentales ratones NSG (Universidad de Nanjing-Instituto de Investigación Biomédica de Nanjing) (hembras, de 6-8 semanas de edad). 10 días antes del inicio del experimento, se inyectaron células tumorales A375 (ATCC) cultivadas, recogidas y suspendidas por vía subcutánea en un lado del abdomen de los ratones a razón de 3×10^6 células/ratón (volumen de inyección 200 μ l) para establecer el modelo en ratón de xenoinjerto de melanoma humano.

20 El día del experimento, el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor formado de cada ratón se midieron con un calibre vernier, y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $V = a \cdot b^2 / 2$. Después los ratones se dividieron en: 5 en el grupo de PBS, 7 en el grupo de control (linfocitos T transfectadas con TCR irrelevante), 10 en el grupo de linfocitos T transfectadas con TCR1 (dominio variable de cadena α SEQ ID NO: 67, dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2) y 10 en el grupo de linfocitos T transfectados con TCR2 (dominio variable de cadena α SEQ ID NO: 68, dominio variable de cadena β SEQ ID NO: 2), y se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el volumen tumoral. Después de la agrupación, los linfocitos T preparados se inyectaron en los ratones de los grupos anteriores a través de la vena de la cola a 1×10^7 /ratón, respectivamente, y a los ratones del grupo de PBS se les inyectaron por vía intravenosa 100 μ l de PBS a través de la vena de la cola.

35 Después de la inyección de TCR-linfocitos T, se tomaron 100 μ l de solución de IL-2 preparada (50000 UI/100 μ l) y se inyectaron por vía intraperitoneal en cada ratón, seguido de una inyección continua de la misma cantidad de solución de IL-2 todos los días durante 4 días. Desde el principio del experimento, el diámetro tumoral del ratón se midió cada 3 días y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con el método anterior hasta que la acción del ratón se vio afectada debido a un tumor excesivo o el tumor retrocedió. Se recopilaron los datos anteriores y se analizaron estadísticamente los volúmenes tumorales de los ratones en cada grupo.

40 Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Fig. 16. En el grupo de ratones a los que se les inyectaron linfocitos T transfectados con el TCR de alta afinidad de la presente divulgación, el crecimiento del tumor se inhibió significativamente y mostró una tendencia a encoger, mientras que en el grupo de ratones a los que se les inyectaron linfocitos T transfectados con TCR irrelevante y en el grupo de ratones a los que se les inyectó PBS, el volumen tumoral aumentó rápidamente.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de linfocitos T (TCR), que tiene una actividad de unión al complejo SLLMWITQC-HLA A2 y comprende un dominio variable de cadena α de TCR y un dominio variable de cadena β de TCR, el dominio variable de cadena α de TCR comprende tres regiones CDR y el dominio variable de cadena β de TCR comprende tres regiones CDR, en donde el TCR tiene una CDR seleccionada del grupo que consiste en:

TCR N.º	CDR1 α	CDR2 α	CDR3 α	CDR1 β	cDR2 β	CDR3 β
19	TSINN	IRSNERE	MYDENGKII	SGHDY	FNNNV	ASSLGSNEQY
20	TSINN	IRSNERE	MYDQNGKII	SGHDY	FNNNV	ASSLGSNEQY.

2. El TCR de la reivindicación 1, en donde el TCR es soluble.

3. El TCR de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el TCR es un TCR heterodimérico $\alpha\beta$.

4. El TCR de la reivindicación 3, en donde el TCR heterodimérico $\alpha\beta$ comprende (i) todo o parte de la cadena α de TCR distinta de su dominio transmembrana, y (ii) todo o parte de la cadena β de TCR distinta de su dominio transmembrana, en donde tanto (i) como (ii) comprenden el dominio variable y al menos una porción del dominio constante de la cadena de TCR.

5. El TCR de la reivindicación 4, en donde un enlace disulfuro intercatenario artificial está contenido entre la región constante de cadena α y la región constante de cadena β del TCR heterodimérico $\alpha\beta$.

6. El TCR de la reivindicación 5, en donde uno o más grupos de aminoácidos seleccionados de los siguientes se sustituyen por restos cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario artificial entre la región constante de cadena α y la región constante de cadena β de TCR heterodimérico $\alpha\beta$:

Thr48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Ser77 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Ser17 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Thr45 del exón 1 de TRAC*01 y Asp59 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Ser15 del exón 1 de TRAC*01 y Glu15 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Arg53 del exón 1 de TRAC*01 y Ser54 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01;
 Pro89 del exón 1 de TRAC*01 y Ala19 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; y
 Tyr10 del exón 1 de TRAC*01 y Glu20 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01.

7. El TCR de la reivindicación 1, en donde el TCR se selecciona del grupo que consiste en:

Número de TCR	Secuencia del dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
19	67	2
20	68	2.

8. El TCR de la reivindicación 1, en donde el TCR es un TCR monocatenario;
 o
 en donde el TCR es un TCR monocatenario que consiste en un dominio variable de cadena α y un dominio variable de cadena β , y el dominio variable de cadena α y el dominio variable de cadena β están conectados por una secuencia peptídica corta flexible (enlazador).

9. El TCR de la reivindicación 8, en donde el núcleo hidrófobo del dominio variable de cadena α y/o el dominio variable de cadena β de TCR está mutado.

10. El TCR de la reivindicación 1, en donde el TCR se selecciona del grupo que consiste en:

Número de TCR	Secuencia del dominio variable de cadena α SEQ ID NO:	Secuencia del dominio variable de cadena β SEQ ID NO:
s-19	18	4
s-20	19	4.

11. El TCR de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un anticuerpo anti-CD3 unido a la cadena α o β del TCR en el extremo C o N.

12. Un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos moléculas de TCR, y al menos una molécula de

TCR es el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

13. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una secuencia complementaria de la misma.

5

14. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.

15. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 14 o que tiene la molécula de ácido nucleico exógena de la reivindicación 9 integrada en su genoma.

10

16. Una célula aislada que expresa el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

17. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o un complejo de TCR de la reivindicación 12, o la célula de la reivindicación 16.

15

18. El TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o el complejo de TCR de la reivindicación 12, o la célula de la reivindicación 16, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad.

20

19. Un método para preparar el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende las etapas de:

(i) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 para expresar el TCR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11;

25

(ii) aislar o purificar el TCR.

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INN LQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGR
LRVTLDTSKRSSLLITASRAADTASYFCATDANGKIIFGKGTRLHLLP
(SEQ ID NO:1)

Fig. 1a

DAGVTQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQIMMRGLELLIYFN NNVPIDDSGM
PEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:2)

Fig. 1b

SQQGEEDPQALS IQEGENVITNCSYKTS INN LQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKRSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGKIIFGKGTRLHLLP (SEQ ID NO:3)

Fig. 2a

DAGVTQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO:4)

Fig. 2b

TCTCAACAAGGtGAAGAAGATCCGCAGGCCCTGAGTATTCAAGAAGGtGAAATGTGACCATCAACTGCTCTTACAAAA
CGAGTATCAACAATCTGCAGTGGTACCGTCAAATTTCTGGCCGCGGTCTGGTTCATCTGATTCTGATCCGTTCCAACGA
ACCGGAAAAACACTCAGCCCGTCTGCGCCTTACCCTGGATACCGCAAAAAATCTTCTAGTCTGGAAATCACCGCAGTC
CGTCCCGCAGATAACGCAAGCTATTTTTGTGCAACCGACGCTAATGGTAAAAATTATCTTCGGCAAAGGTACCCGCTGC
ATATTCTGCCG (SEQ ID NO:5)

Fig. 3a

GATGCGGGTGTACCGCAGTCTCCGCGTCATGAAAGTGTGGAAATGGGCCAAGAAGTTACGCTGCGCTGCAAACCGATCA
GCGGTACGACTACCTGTTTTGGTACCGTACGACCCGAAACGCGGCTGGAAGTCTGATCTACTTCAACAATAACGT
TCCGATTGATGACTCGGGTATGCCGGAAGATCGTTTTAGCGCGAAAAATGCCGAATGCCCTCGTTACGACCGCTGAAAAAT
CAGCGGTGCAACCGCGTACTCCGCAGTGTATTTTTGTGCTTCTCTACTGGCAGTAACGAACAGTACTTCCGCCCGG
GTACCCGCTGACCGTGACG (SEQ ID NO:6)

Fig. 3b

GGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTG (SEQ ID NO:7)

Fig. 4a

GGCGGTGGCTCCGAAGGTGGCGGTTCAGAAGCGGTGGCTCGGAAGGTGGCGGTAGCGAAGGCGGTACCGGT (SEQ ID
NO:8)

Fig. 4b

SQQGEEDPQALS IQEGENVITNCSYKTS INN LQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKRSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHLLP
(SEQ ID NO:9)

Fig. 5 (1)

SQQGEEDPQALS IQEGENVITNCSYKTS INN LQWYRQNSGRGLVHLIL IRIGEQEKHSGRLRVTLDTSKRSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHLLP
(SEQ ID NO:10)

Fig. 5 (2)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:11)

Fig. 5 (3)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:12)

Fig. 5 (4)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:13)

Fig. 5 (5)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:14)

Fig. 5 (6)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:15)

Fig. 5 (7)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:16)

Fig. 5 (8)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:17)

Fig. 5 (9)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCMYDQNGK IIFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:18)

Fig. 5 (10)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCMYDQNGK IIFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:19)

Fig. 5 (11)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDAYGTVQFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:20)

Fig. 5 (12)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGIVQFGKGT RLHLLP
(SEQ ID NO:21)

Fig. 5 (13)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGSYQFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:22)

Fig. 5 (14)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDAYGRYTFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:23)

Fig. 5 (15)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGWKFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:24)

Fig. 5 (16)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDAYLPIFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:25)

Fig. 5 (17)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGLPVFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:26)

Fig. 5 (18)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGRWFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:27)

Fig. 5 (19)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGTVFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:28)

Fig. 5 (20)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGRWVFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:29)

Fig. 5 (21)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGLWVFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:30)

Fig. 5 (22)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKGWAGNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGGEKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:31)

Fig. 5 (23)

SQQGEEDPQALS IQEGENVTINC SYKGWAGNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGGAEKHSGR LRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWDFGGKTRLHILP

(SEQ ID NO:32)

Fig. 5 (24)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDAFAAWWIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO: 33)

Fig. 5 (25)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO: 34)

Fig. 5 (26)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDAFAAWWIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO: 35)

Fig. 3 (27)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO: 36)

Fig. 5 (28)

SQQGEEDPQALS IQEGENVT INCSYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO: 37)

Fig. 5 (29)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNIGAVIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASSLGSENEYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 38)

Fig. 6 (1)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNIGAVIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGSENEYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 39)

Fig. 6 (2)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNIGAVIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGANEQYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 40)

Fig. 6 (3)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNIGAVIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGSENEYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 41)

Fig. 6 (4)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNIGAVIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGANEQYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 42)

Fig. 6 (5)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGSENEYFGPGTRLTVT

(SEQ ID NO: 43)

Fig. 6 (6)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQKGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:44)

Fig. 6 (7)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:45)

Fig. 6 (8)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQRGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:46)

Fig. 6 (9)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQMGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:47)

Fig. 6 (10)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGSNEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:48)

Fig. 6 (11)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQLGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:49)

Fig. 6 (12)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQMGANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:50)

Fig. 6 (13)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQRCSNEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:51)

Fig. 6 (14)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASQMCANEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:52)

Fig. 6 (15)

DAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPVEPRDSAVYFCASMLGSNEQYFGPGTRLTYT

(SEQ ID NO:53)

Fig. 6 (16)

SQQGEEDPQALSIQEGENVITNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLLILRSNEREKHSGRLEVTLDTSKSSSLEITAV
RPADTASYFCATDANGKLLI FGRGTRLHLLPGGGSEGGSEGGSEGGSEGGTGDAGVTQSPRHESVEMGQEVTLRCKP
ISGHDYLFWYRQTPKRGLELLIYFNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPVEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFG
PGTRLTYT (SEQ ID NO:54)

Fig. 7a

TCTCAACAAGGtGAAGAAGATCCGCAGGCCCTGAGTATTCAAGAAGGTGAAAATGTGtCCATCAACTGCTCTTACAAAA
 CGAGTATCAACAATCTGCAGTGGTACCGTCAAAAATTCGGCCCGGGTCTGGTTCATCTGATCTGATCCGTTCCAACGA
 ACGCGAAAACACTCAGGCCGICTGCGCGGTACCCCTGGATAACCAGCAAAAATCTTCTAGTCTGGAAATCACCGCAGTC
 CGTCCCGCAGATACGGCAAGCTATTTTGTGCAACCGACGCTAATGGTAAAATTATCTTCGGCAAAAGTACCCGCCCTGC
 ATATTCTGCCGGCGGGTGGCTCCGAAGGTGGCGGTTTCAAGGGCGGTGGCTCGGAAGGTGGCGGTAGCGAAGGCCGTAC
 CCGTGATGCGGGTGTCAACGAGTCTCCGCGTCAAGAAAGTGTGGAAATGGGCCAAGAAGTACGCTGCGCTGCAAACCG
 ATCAGCGGTACGACTACCTGTTTGGTACCGTCAGACCCGAAACGGCGCTGGAACTGCTGATCTACTTCAACAATA
 ACGTTCGGATTGATGACTCGGGTATGCCGGAAGATCGTITTAGCGCGAAAATGCCGAATGCTCGTTCAGCAGCTGAA
 AATTCAGCGGTGGAACCGCGTACTCCGAGTGTATTTTGTGCTTCTCACTGGCAGTAACGAACAGTACTTCGGC
 CCGGTACCCGTCTGACCGTGACG (SEQ ID NO:55)

Fig. 7b

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANGKIIFGKGTRLHILPNTQNPDPVYQLRDSKSSDRKSVCLFDFFDSQTINVSQSKDSVYITDK**CV**
 LDMRSMDFKSNsAVAWsNKSDFACANAFNNSIHPEDTFPPSPSS (SEQ ID NO:56)

Fig. 8a

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMRRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
 QPSEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFGPGTRLTIVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYDHOVELSWW
 VNGKEVHSGV**CT**DPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCCVQFYGLSENDEWTQBRAPVTQIVSABE
 WGRAD (SEQ ID NO:57)

Fig. 8b

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDAFAWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:58)

Fig. 9 (1)

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKGWAGNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:59)

Fig. 9 (2)

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKSIQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:60)

Fig. 9 (3)

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKSIQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:61)

Fig. 9 (4)

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKWAGNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:62)

Fig. 9 (5)

SQGGEDPQALS IQEGENATMNC SYKWAGNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEQEKHSGRRLRVTLDTSKRSSSLITAS
 RAADTASYFCATDANARWIFGKGTRLHILP
 (SEQ ID NO:63)

Fig. 9 (6)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDANARWDFFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:64)

Fig. 9 (7)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGWAQNRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAAD
TASYFCATDANARWDFFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:65)

Fig. 9 (8)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDANARWDFFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:66)

Fig. 9 (9)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCMYDENGKIIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:67)

Fig. 9 (10)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCMYDENGKIIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:68)

Fig. 9 (11)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDAYGTVQFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:69)

Fig. 9 (12)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDANGLVQFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:70)

Fig. 9 (13)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDANGSVQFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:71)

Fig. 9 (14)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDAYGRYIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:72)

Fig. 9 (15)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDANGQWKFFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:73)

Fig. 9 (16)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLIL IRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITAS
RAADTASYFCATDAYGLPIFGKGTRLHLLP

(SEQ ID NO:74)

Fig. 9 (17)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANGLPVEFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:75)

Fig. 9 (18)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANGRWEFVGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:76)

Fig. 9 (19)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANGTVGFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:77)

Fig. 9 (20)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANGRWMFVGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:78)

Fig. 9 (21)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANGLWVFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:79)

Fig. 9 (22)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKWAQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANARWDFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:80)

Fig. 9 (23)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKWAQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGGAEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANARWEFVGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:81)

Fig. 9 (24)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDAFAWWIFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:82)

Fig. 9 (25)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGVQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDANARWVFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:83)

Fig. 9 (26)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKGS IQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRTGEEKHSGRRLRVTLDTSKKSSSLITAS
RAADTASYFCATDAWARWIFGKGRHLHLP

(SEQ ID NO:84)

Fig. 9 (27)

SQQGEEDFQALS IQEGENATMNC SYK GWQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRIGQA EKHSGRIRVTLDTSKRSSSLITAS
RAADTASYFCATDANAR WEFGRGTRLHLLP
(SEQ ID NO:85)

Fig. 9 (28)

SQQGEEDFQALS IQEGENATMNC SYK GSIQNLQWYRQNSGRGLVHLILIRIG EQEKHSGRIRVTLDTSKRSSSLITAS
RAADTASYFCATDANAR WEFGRGTRLHLLP
(SEQ ID NO:86)

Fig. 9 (29)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN HGAV IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:87)

Fig. 10 (1)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN HGAV IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QRGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:88)

Fig. 10 (2)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN HGAV IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QRGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:89)

Fig. 10 (3)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN HGAV IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QLGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:90)

Fig. 10 (4)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN HGAV IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QLGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:91)

Fig. 10 (5)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVP IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QLGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:92)

Fig. 10 (6)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVP IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QKGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:93)

Fig. 10 (7)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVP IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QLPNEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:94)

Fig. 10 (8)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVP IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCAS QRGANEQYFGPGTRLTVT
(SEQ ID NO:95)

Fig. 10 (9)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN⁹⁶NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQMG⁹⁶SNEQYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:96)

Fig. 10 (10)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN⁹⁷NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQLGS⁹⁷SNEQYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:97)

Fig. 10 (11)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN⁹⁸NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQLGANE⁹⁸QYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:98)

Fig. 10 (12)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN⁹⁹NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQMG⁹⁹SNEQYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:99)

Fig. 10 (13)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN¹⁰⁰NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQRGS¹⁰⁰SNEQYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:100)

Fig. 10 (14)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN¹⁰¹NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASQMGANE¹⁰¹QYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:101)

Fig. 10 (15)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN¹⁰²NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASMLGS¹⁰²SNEQYFGPGTRLIVT
(SEQ ID NO:102)

Fig. 10 (16)

SQQGEEDPQALS IQEGENATMNC SYKTS INN LQWYRQNSGRGLVHL LLIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKR SSSLLITAS
RAADTASYFCATDANGKITFGK GTRLJHLPNIQN PDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDS DVYITDR TV
LDMRSMDFKSN SAVAWSNR SDFACANAFNNS I LPEDTFFP SPSS
(SEQ ID NO:103)

Fig. 11a

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN¹⁰⁴NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI
QPSEPRDSAVYFCASSLGSNEQYFGPGTRLIVTEDLN¹⁰⁴VFPPEVAVPEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFPYPDHVELSWF
VNGREVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRARPV TQIVSAEA
WGRAD
(SEQ ID NO:104)

Fig. 11b

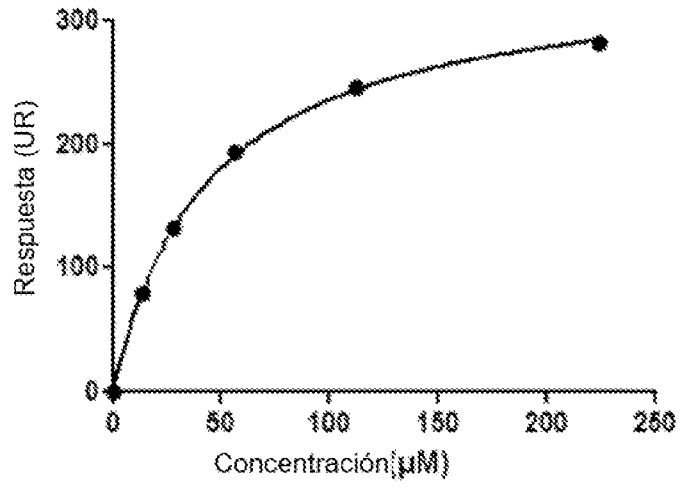


Fig. 12

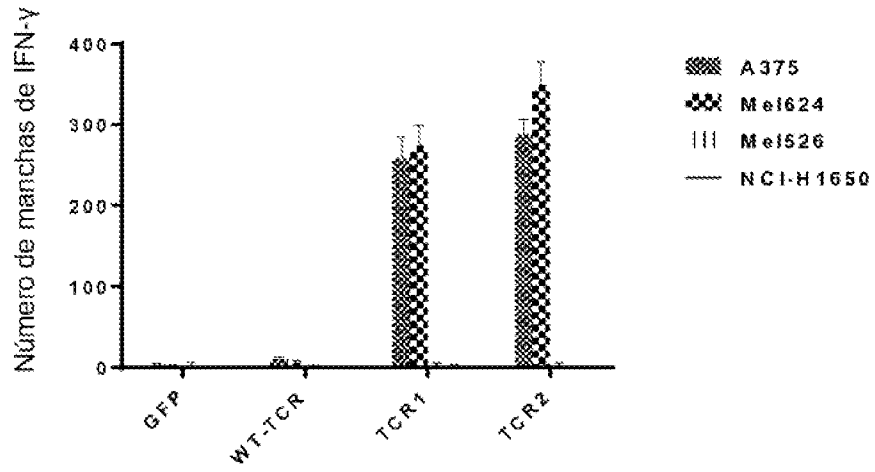


Fig. 13

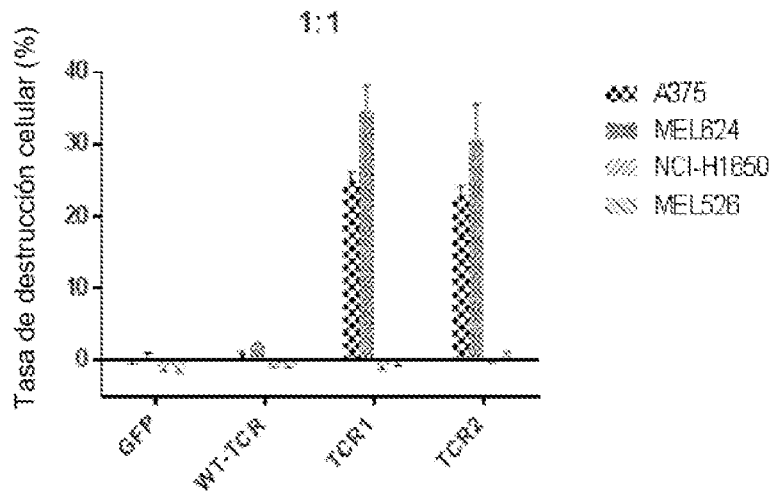
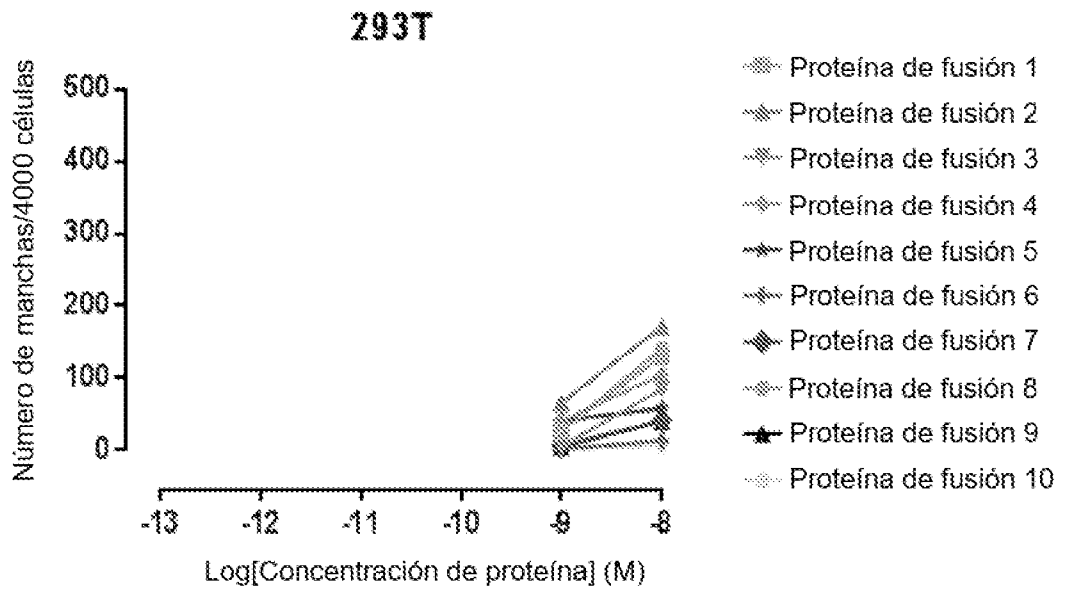
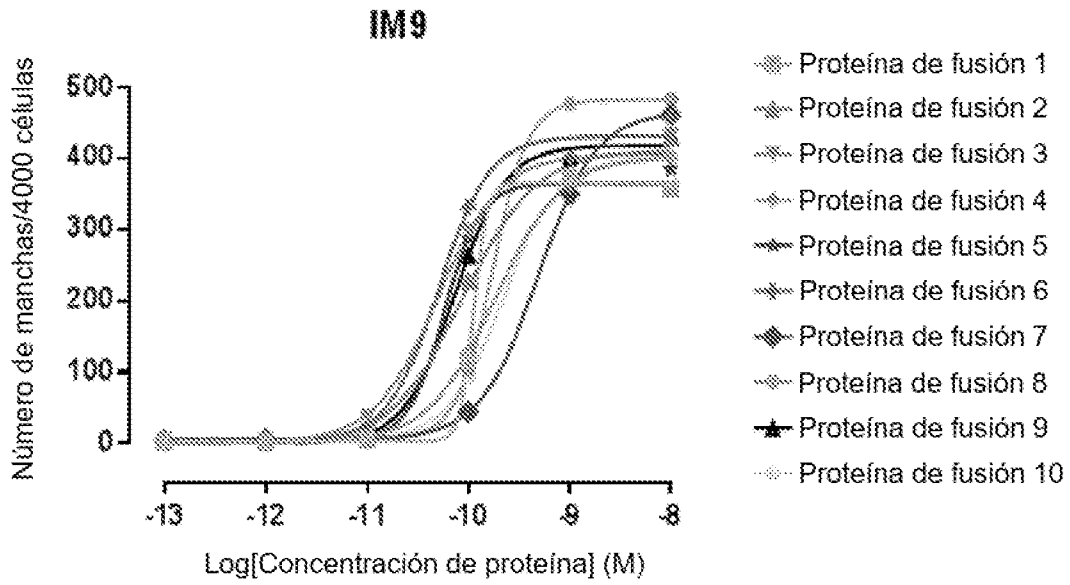


Fig. 14



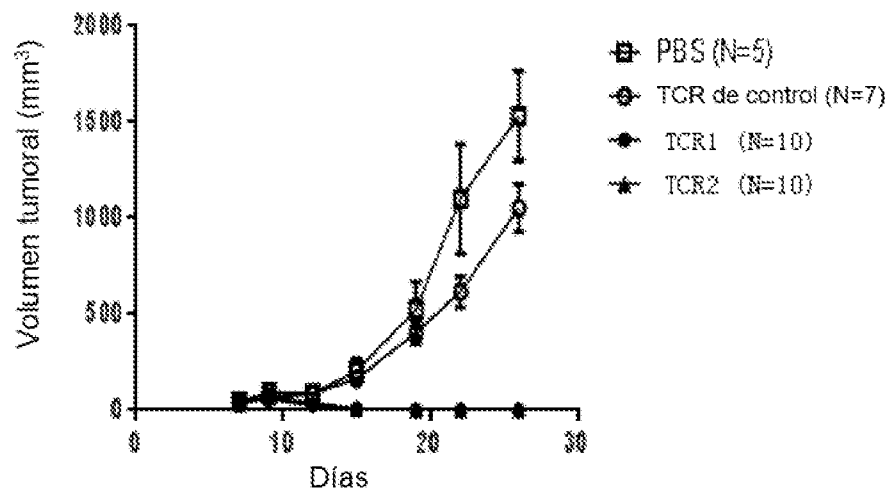


Fig. 16