(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 954 307**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2017 PCT/GB2017/053167**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018 WO18073595**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2017 E 17800571 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 3529267**

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

(30) Prioridad:

19.10.2016 GB 201617714

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2023

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

DESCRIPCIÓN

Receptor de células T

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un receptor de células T (TCR). En particular, la presente invención se refiere a métodos para aumentar la dimerización del TCR y/o métodos para reducir el emparejamiento incorrecto del TCR y/o métodos para aumentar la expresión de un TCR en la superficie celular cuando se expresa como un TCR exógeno, a métodos para seleccionar tales TCR y métodos para identificar residuos que contribuyen a la dimerización del TCR y/o para reducir el emparejamiento incorrecto del TCR y/o aumentar el nivel de expresión de la superficie celular de un TCR. La presente invención también se refiere a un TCR diseñado que tiene un alto nivel de expresión en la superficie celular cuando se expresa como un TCR exógeno en comparación con la secuencia del TCR de la línea germinal correspondiente.

Antecedentes de la invención

La terapia génica del receptor de células T (TCR) es la transferencia de cadenas TCR específicas de antígeno a las células T receptoras, redirigiendo así la especificidad de los linfocitos T a los antígenos diana de interés.

El documento EP3015477 divulga un receptor de células T de alta estabilidad que tiene mutaciones en su dominio central hidrófobo que provocan la mejora de la estabilidad del mismo.

El documento WO2016/170320 divulga un TCR diseñado que tiene un alto nivel de expresión en la superficie celular, en el que el TCR diseñado comprende al menos un residuo de aminoácido específico que no está presente en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente.

Robbins et al. divulga que las sustituciones de aminoácidos simples y dobles en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del TCR pueden mejorar las funciones de las células T específicas de antígeno (Robbins et al. (2008), The Journal of lmmunology180: 6116-6131).

Los TCR introducidos difieren mucho en su capacidad para expresarse en la superficie celular. Los TCR fuertemente expresados introducidos se expresan conjuntamente con el TCR endógeno o incluso pueden competir con el TCR endógeno en la expresión de la superficie celular. Los TCR débilmente expresados introducidos están ausentes de la superficie celular cuando se expresan conjuntamente con un TCR fuerte endógeno (Figura 1).

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

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

Resumen de aspectos de la invención

Los presentes inventores han determinado que los residuos de aminoácidos presentes en una serie de posiciones de aminoácidos clave dentro de las regiones marco del TCR mejoran la expresión de la superficie celular del TCR. Los presentes inventores han determinado además que los residuos de aminoácidos presentes en estas posiciones de aminoácidos clave dentro de la región marco del TCR pueden mejorar la dimerización de los TCR y/o reducir el emparejamiento incorrecto de los TCR, por ejemplo, cuando se expresan como un TCR exógeno.

En particular, los inventores han determinado que los residuos de aminoácidos especificados para la posición dada enumerada en el Grupo (I), o residuos de aminoácidos con propiedades bioquímicas similares, mejoran la dimerización de los TCR y/o reducen el emparejamiento incorrecto de los TCR y/o aumentan la expresión en la superficie celular de los TCR. En particular, los residuos de aminoácidos presentes en varias posiciones de aminoácidos clave dentro de las regiones marco del TCR mejoran la expresión de la superficie celular del TCR.

Los residuos de aminoácidos y las posiciones relevantes del Grupo (I) son L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α.

Los residuos identificados afectan las características estructurales del TCR. Por lo tanto, se espera que los residuos conservados con propiedades similares tengan efectos estructurales similares. En particular, se espera que los residuos encontrados en proteínas homólogas con función conservada de acuerdo con lo definido por la puntuación de Blosum62 tengan efectos similares en la fuerza del TCR. Por ejemplo, también se espera que los aminoácidos conservados y los aminoácidos respectivos con un puntaje de Blosum62 superior a 0 mejoren la expresión del TCR.

Se ha demostrado que la sustitución con estos residuos de aminoácidos clave en un TCR débilmente expresado da como resultado una expresión muy mejorada. También se ha demostrado que las sustituciones de aminoácidos individuales de residuos clave individuales para reemplazar residuos 'débiles' con residuos de aminoácidos 'fuertes'

como se define en la presente invención, así como una variedad de combinaciones de sustitución de aminoácidos, aumentaron la expresión del TCR.

Ventajosamente, la tecnología de la presente divulgación es eficaz incluso cuando los dominios constantes del TCR son completamente humanos.

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

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión en la superficie celular de un TCR que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;

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

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; y

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

leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α;

arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β;

tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β;

treonina o serina en la posición 24 de la cadena α;

valina, isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α;

en el que los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT), y con la condición de que cuando solo se altera un aminoácido en la etapa (iii) el aminoácido alterado generado no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I):

(I) L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; y

cuando se alteran dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (iii) al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados generados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I).

En este documento se describe un método que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;

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

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

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

un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 96 de la cadena α;

un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 9 de la cadena β;

un aminoácido aromático en la posición 10 de la cadena β;

un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 24 de la cadena α;

un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 20 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o una isoleucina, leucina o valina en la posición 50 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 5 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga, un ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 8 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 86 de la cadena α;
un aminoácido aromático en la posición 39 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 55 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 43 de la cadena β;
un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 66 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena β;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena β;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 103 de la cadena β;
un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 3 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 7 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar en la posición 9 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una isoleucina, leucina o valina en la posición 11 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 16 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 18 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 22 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 26 de la cadena α;
un aminoácido aromático en la posición 40 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 47 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 48 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 49 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 51 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 52 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 53 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 67 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 68 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 74 de la cadena α;
un aminoácido aromático en la posición 76 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 79 de la cadena α;
un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 81 de la cadena α;
un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 83 de la cadena α;
un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 90 de la cadena α;

un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 92 de la cadena α;

un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 93 de la cadena α;

un aminoácido alifático no polar o una isoleucina, leucina o valina en la posición 101 de la cadena α;

con la condición de que cuando solo se altera un aminoácido en la etapa (iii) el aminoácido alterado generado no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I'):

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

cuando se alteran dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (iii) al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados generados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I').

Descripción de las figuras

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

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

Figura 3 - Clonotipado del TCR del TCR endógeno fuerte y débil

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

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

Figura 5 - Expresión del TCR fuerte y débil en un entorno no competitivo (células Jurkat sin TCR).

Figura 6 - Expresión del TCR fuerte y débil en un entorno competitivo (células Jurkat que expresan el TCR híbrido WT1).

Figura 7 - Expresión del TCR fuerte y débil en células Jurkat que expresan expresión baja, media y alta del TCR WT1 modificado.

Figura 8 - Análisis bioinformáticos del TCR de expresión fuerte y débil.

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

B) Análisis de la estructura 3D predicha de segmentos variables TCR fuertes y débiles.

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

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

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

Figura 12 - Un dispositivo informático de uso general que se utiliza para proporcionar o dar soporte a algunas realizaciones.

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

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

Figura 15 - El cambio de residuos de dominio variable a L96α, R9β y Y10β mejora la expresión de CMV y TCR WT1 en células T primarias de sangre periférica.

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

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

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

Figura 19 - Matriz de puntuación BLOSUM62.

Figura 20 - La introducción de L96α, R9β e Y10β aumenta la expresión en la superficie celular del TCR más débil.

Figura 21 - La introducción de L96α, R9β e Y10β aumenta la expresión en la superficie celular del TCR específicos de péptidos en células Jurkat sin TCR endógeno.

Figura 22 - La introducción de L96α, R9β y Y10β aumenta la expresión en la superficie celular del TCR específicos de péptido en células Jurkat que también expresan un TCR WT1 exógeno.

Figura 23 - Los niveles intracelulares de mRNA y proteína son similares para TCR que se expresan fuerte y pobremente en la superficie celular. Las células Jurkat se transdujeron con 4 construcciones del TCR. (a) La tinción de la superficie anti-V5 fue seguida por permeabilización celular y tinción de ARN de flujo principal de Affymetrix para determinar la expresión del TCRα en la superficie celular y el ARNm del TCRα/β intracelular, respectivamente. Los gráficos de puntos muestran los niveles de superficie del TCRα y los niveles de ARNm del TCRα/β intracelular de células Jurkat seleccionadas que expresan cantidades equivalentes de CD19. El diagrama de la derecha muestra el resumen de los niveles de expresión de ARNm del TCRα/β de los 4 TCR analizados. (b) Las células Jurkat se transdujeron con w-> domTCR y w-> domTCR seguido de clasificación por citometría de flujo para purificar las células con altos niveles de expresión de CD19. Estas células se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos anti-CD19 (verde) y anticuerpos anti-V5 para la expresión del TCRα (rojo) seguido de microscopía confocal. El panel inferior muestra la superposición de la expresión de CD19 y V5/TCRα. (c) Análisis de células individuales de datos confocales que muestran la cuantificación de la expresión de CD19 y V5/TCRα de células transducidas con w-> domTCR (rojo) y d->weakTCR (azul). (d) Los niveles de superficie celular de CD19 y V5/TCRα de las mismas construcciones del TCR se determinaron mediante citometría de flujo de células no permeabilizadas.

Figura 24 - Frecuencia de uso del segmento del gen V en la biblioteca del TCR de expresión alta/dominante (barras sólidas) y TCR de expresión débil/baja (barras vacías) En función de su posición dentro de la estructura 3D, los residuos identificados se agruparon ampliamente en cuatro clases de residuos que difieren entre los dominios TCR V débiles y fuertes y se muestran para TRAV38.2 y TRBV7.8: 1. Disolvente expuesto (posibles efectos sobre el plegamiento); 2. Residuos en el núcleo hidrófobo del dominio (que probablemente afecten la estabilidad del dominio V); 3. Residuos en la interfaz entre los dominios Vα y Vβ (es decir, potencialmente implicados en interacciones entre cadenas); 4. Residuo en la interfaz entre el dominio V y C de una sola cadena (es decir, potencialmente implicado en interacciones intracadena).

Figura 25 - El modelado estructural proporciona información sobre el papel mecánico de los residuos del marco en la estabilidad del TCR. La estructura tridimensional publicada del 3PL6 TCR (TRAV13-1/TRBV7-3) se utilizó como modelo para el TCR de baja expresión (TRAV13-474 2/TRBV7-3) utilizado en este estudio. (a) Se indica la ubicación de los 14 residuos que se cambiaron en el TCR de baja expresión para mejorar la expresión de la superficie del TCR. (b) El cambio de P96α a L96α mejora la interacción entre la variable y el dominio constante de la cadena α. (c) El cambio de S9β y N10β a R9β e Y10β mejora la interacción entre el dominio variable y constante de la cadena β. (d) El cambio de S19α a V19α mejora las interacciones hidrófobas dentro de un núcleo hidrófobo de la cadena α. (e) El reemplazo de A24α con T24α puede mejorar las interacciones de los enlaces de hidrógeno con el nitrógeno del anillo de imidazol de H86α.

Figura 26 - El reemplazo de 3 residuos del marco mejora constantemente la expresión del TCR al tiempo que reduce el emparejamiento incorrecto del TCR. El papel de L96α y R9β/Y10β se probó en 3 TCR de baja expresión

seleccionados de la biblioteca del TCR de baja expresión y en 5 TCR específicos de antígeno (2 TCR específicos para CMV-pp65, 2 TCR específicos para el antígeno de histocompatibilidad menor HA1 27 y 1 TCR específico para el antígeno menor de histocompatibilidad HA2). (a) Las células Jurkat se transdujeron con los TCR de tipo silvestre indicados (fila superior) o el TCR modificado que contiene L96α, R9β, Y10β. Expresión de superficie α/β de células cerradas que expresan niveles equivalentes de CD19. (b) Resumen de la expresión del TCR α/β de los 8 TCR de tipo silvestre y TCR modificados con LRY. Representante de 3 experimentos separados. (c) Las células T de sangre periférica humana se transdujeron con los TCR de tipo silvestre indicados y las variantes modificadas con LRY. Los diagramas de puntos muestran la expresión de la cadena α y β del TCR introducida en células T sincronizadas que expresan niveles equivalentes de CD19.

Figura 27 - Demostración de la expresión en la superficie celular con más residuos de aminoácidos. Se utilizaron clasificaciones Blosum62 para determinar los aminoácidos conservados para un subconjunto de residuos fuertes previamente identificados. Se generó una serie de construcciones del TCR usando mutagénesis QuikChange, usando el TCR débil genérico descrito en este documento como plantilla de ADN.

Las construcciones se transfectaron en células Phoenix-Ampho y se realizó la transducción en células Jurkat que (i) no tienen o (ii) tienen un TCR endógeno. Se realizó la expresión de cada TCR en células Jurkat con/sin TCR endógeno, usando los residuos de aminoácidos fuertes identificados originalmente para la comparación.

Figura 28 - Esquema de construcciones TCR que contienen la modificación C=C, la modificación de dominancia (LRY) o ambas.

Figura 29 - Análisis de los tres TCR con las modificaciones apropiadas en células Jurkat humanas que no expresan un TCR endógeno. Se muestra el nivel de expresión de la cadena alfa del TCR (tinción V-5; eje y) y la expresión de la cadena beta del TCR (tinción de myc; eje x) de células altas CD19 seleccionadas.

Figura 30 - Análisis de los tres TCR con las modificaciones apropiadas en células Jurkat humanas que sí expresan un TCR endógeno. Se muestra la eficacia de transducción medida por porcentaje y MFI de expresión de CD19. Se analizaron los niveles de expresión del TCR en las células CD19 altas sincronizadas.

Figura 31 - Análisis de los tres TCR con las modificaciones apropiadas en células Jurkat humanas que sí expresan un TCR endógeno. Se muestra el nivel de expresión de la cadena alfa del TCR (tinción V-5; eje y) y la expresión de la cadena beta del TCR (tinción de myc; eje x) de células altas CD19 seleccionadas.

Descripción detallada

Receptor de células T

Durante el procesamiento de antígenos, los antígenos se degradan dentro de las células y luego son llevados a la superficie celular por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células T son capaces de reconocer este complejo de péptido:MHC en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Hay dos clases diferentes de moléculas MHC, MHC I y MHC II, que entregan péptidos desde diferentes compartimentos celulares a la superficie celular.

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

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

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

El dominio variable de la cadena α y la cadena β del TCR tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) o hipervariables. CDR3 es el principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que CDR1 de la cadena alfa interactúa con la parte de terminal N del péptido antigénico, mientras que CDR1 de la cadena beta interactúa con la parte terminal C del péptido. Se considera que CDR2 reconoce la molécula MHC. Las regiones del marco (FR) se colocan entre los CDR. Estas regiones proporcionan la estructura de la región variable del TCR.

El repertorio de regiones variables del TCR se genera mediante la unión combinatoria de genes variables (V), de unión (J) y de diversidad (D); y por diversificación de la región N (nucleótidos insertados por la enzima desoxinucleotidil-transferasa). Las cadenas α y γ se forman a partir de eventos de recombinación entre los segmentos V y J. Las cadenas β y δ se forman a partir de eventos de recombinación que involucran los segmentos V, D y J.

El locus TCRα humano, que también incluye el locus TCRδ, se encuentra en el cromosoma 14 (14q11.2). El locus TCRβ se encuentra en el cromosoma 7 (7q34). La región variable de la cadena TCRα está formada por la

recombinación entre uno de los 46 segmentos Vα (variables) diferentes y uno de los 58 segmentos Jα (unión) (Koop et al.; 1994; Genomics; 19: 478-493). La región variable de una cadena TCRβ se forma a partir de la recombinación entre 54 Vβ, 14 Jβ y 2 segmentos Dβ (diversidad) (Rowen et al.; 1996; Science; 272:1755-1762).

Los segmentos del gen V y J (y D de acuerdo con corresponda) para cada locus de la cadena TCR han sido identificados y la secuencia de la línea germinal de cada gen es conocida y anotada (por ejemplo, ver Scaviner y Lefranc; 2000; Exp Clin Immunogenet; 17:83-96 y Folch y Lefranc; 2000; Exp Clin Immunogenet; 17:42-54).

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3 de la cadena α están codificados por el gen Vα. FR4 está codificado por el gen Jα (Figura 1B).

FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3 de la cadena β están codificados por el gen Vβ. CDR3 está codificado por el gen Dβ y FR4 está codificado por el gen Jβ (Figura 1B).

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

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

En una realización, los dominios constantes empleados en el TCR son secuencias humanas.

En una realización, los dominios constantes empleados en el TCR son secuencias murinas.

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

La señal del complejo de células T se ve reforzada por la unión simultánea de las moléculas MHC por un correceptor específico. En las células T auxiliares, este co-receptor es CD4 (específico para MHC de clase II); mientras que en las células T citotóxicas, este co-receptor es CD8 (específico para MHC de clase I). El co-receptor no solo asegura la especificidad del TCR por un antígeno, sino que también permite la interacción prolongada entre la célula presentadora de antígeno y la célula T y recluta moléculas esenciales (por ejemplo, LCK) dentro de la célula involucrada en la señalización del linfocito T activado.

El término “receptor de células T” se usa así en el sentido convencional para referirse a una molécula capaz de reconocer un péptido cuando se presenta por una molécula de MHC. La molécula puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser una construcción del TCR de cadena sencilla.

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

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

El presente TCR diseñado comprende uno o más residuos de aminoácidos como se define en el presente documento que no está codificado por el gen Vα o Vβ de la línea germinal. En otras palabras, el TCR diseñado comprende una cadena α y/o cadena β que comprende un residuo de aminoácido alterado en una o más de las posiciones descritas en este documento, en comparación con la cadena α y/o cadena β correspondiente codificada por el gen Vα o Vβ de línea germinal inalterada.

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

Las delimitaciones de las regiones FR y CDR se definen dentro del sistema de numeración IMGT. La región FR1 comprende las posiciones 1-26 (25-26 aminoácidos, dependiendo del grupo o subgrupo V-GENE) con 1st-CYS en la posición 23. La región FR2 comprende las posiciones 39-55 (16-17 aminoácidos) con un TRP conservado en la

posición 41. La región FR3 comprende las posiciones 66-104 (36-39 aminoácidos, dependiendo del grupo o subgrupo VGENE) con un aminoácido hidrófobo conservado en la posición 89 y el 2nd-CYS en la posición 104. El residuo 1 del sistema de numeración IMGT es el primer residuo en FR1. El residuo 104 del sistema de numeración IMGT es el último residuo en FR3.

Como tal, el sistema de numeración utilizado aquí se refiere a la posición del aminoácido dentro de la cadena α completa o de la cadena β completa, según corresponda.

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

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

Por ejemplo, se puede realizar mutagénesis para alterar nucleótidos específicos en una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR. Tal mutagénesis alterará la secuencia de aminoácidos del TCR para que comprenda uno o más de los residuos de aminoácidos como se describe en este documento.

Un ejemplo de un método de mutagénesis es el método Quikchange (Papworth et al.; 1996; Estrategias; 9(3); 3-4). Este método implica el uso de un par de cebadores mutagénicos complementarios para amplificar una secuencia de ácido nucleico molde en una reacción de termociclado usando una polimerasa de ADN de alta fidelidad que no desplaza la cadena, como fpu polimerasa

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

Como se usa en este documento, la expresión en la superficie celular es sinónimo de fuerza de expresión. Como tal, la expresión “fuerte” o “alta” es equivalente a altos niveles de expresión del TCR en la superficie celular. La expresión “débil” o “baja” es equivalente a niveles bajos de expresión del TCR en la superficie celular.

El aumento de la expresión en la superficie celular de un TCR significa que un TCR que comprende uno o más residuos de aminoácidos como se describe en el presente documento tiene un mayor nivel de expresión en la superficie celular en relación con un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal. Un TCR equivalente que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de la línea germinal se refiere a un TCR que no ha sido alterado para comprender un residuo de aminoácido que no pertenece a la línea germinal en una posición dada como se describe en este documento, es decir, el TCR inalterado tiene el residuo de aminoácido tipo silvestre en la posición específica.

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

La expresión en la superficie celular de un TCR puede determinarse mediante métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, la expresión de la superficie celular de un TCR puede determinarse usando métodos de citometría de flujo convencionales conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Shapiro; Citometría de flujo práctica; Juan 2005; Ciencia).

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

La expresión de la superficie celular de un TCR puede expresarse como el porcentaje de células dentro de una población que expresa el TCR en la superficie celular. Tal porcentaje puede determinarse utilizando métodos de citometría de flujo convencionales como es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Shapiro; como se indica arriba y abajo). Henel et al.; 2007; Lab Medicine; 38; 7; 428-436).

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

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

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

Los métodos y los TCR de la presente invención pueden mejorar la dimerización de la cadena α y la cadena β del TCR. En particular, los métodos y los TCR de la presente invención pueden mejorar la dimerización de la cadena α y la cadena β presentes cuando se expresan de forma recombinante, por ejemplo, como un TCR exógeno en una célula (por ejemplo, una célula como se describe en este documento).

Los métodos y los TCR de la presente invención pueden reducir el emparejamiento erróneo entre la cadena α y/o la cadena β del TCR de la presente invención. En particular, los métodos y los TCR de la presente invención pueden reducir el emparejamiento erróneo entre la presente cadena α y/o cadena β del TCR y una cadena α y/o cadena β endógena de una célula.

Los métodos y los TCR de la presente invención pueden mejorar la dimerización de la cadena α y la cadena β del TCR y reducir el emparejamiento erróneo entre la cadena α y/o la cadena β del TCR de la presente invención.

Sin desear limitarse a la teoría, los presentes inventores consideran que la dimerización mejorada y/o el emparejamiento erróneo reducido descritos en el presente documento pueden, por ejemplo, contribuir a la expresión aumentada en la superficie celular proporcionada por la presente invención. Dichos efectos son de carácter similar a los descritos para otras tecnologías, como la introducción de un segundo enlace disulfuro diseñado en la región constante de un TCR exógeno. De acuerdo con lo anterior, los métodos y TCR de la presente invención proporcionan métodos adicionales para mejorar la dimerización y/o reducir el emparejamiento erróneo de una cadena α y una cadena β del TCR cuando se expresan de forma recombinante, por ejemplo, como un TCR exógeno en una célula.

Se describe en el presente documento, un TCR modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos seleccionados del Grupo (A):

Grupo (A): un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 96 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 9 de la cadena β; un aminoácido aromático en la posición 10 de la cadena β; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 24 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 20 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o una isoleucina, leucina o valina en la posición 50 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 5 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, un ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 8 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 86 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 39 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 55 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 43 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 66 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 103 de la cadena β; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 3 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 7 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar en la posición 9 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o una isoleucina, leucina o valina en la posición 11 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 16 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 18 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 22 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 26 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 40 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 47 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 48 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 49 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 51 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 52 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 53 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 67 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 68 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 74 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 76 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 79 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 81 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 83 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 90 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 92 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 93 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o una isoleucina, leucina o valina en la posición 101 de la cadena α; en el que uno o más residuos de aminoácidos no están presentes en la correspondiente secuencia de aminoácidos del TCR de la línea germinal;

con la condición de que cuando el TCR diseñado tenga solo un aminoácido alterado en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I'):

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

cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de línea germinal correspondiente, al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I').

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una leucina, isoleucina, valina o una metionina en la posición 96 de la cadena α y, opcionalmente, uno o más residuos de aminoácidos adicionales en una posición determinada como se enumeran en el Grupo (A); en la que la leucina, isoleucina, valina o una metionina en la posición 96 de la cadena α y uno o más residuos de aminoácidos adicionales opcionales en una posición dada como se enumeran en el Grupo (A) no están presentes en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente; con la salvedad de que cuando el TCR diseñado tiene solo un aminoácido alterado que es leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no es L96 de la cadena α; y cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una arginina, lisina o una glutamina en la posición 9 de la cadena β y, opcionalmente, uno o más residuos de aminoácidos adicionales en una posición dada como se enumera en el Grupo (A); en la que la arginina, lisina o una glutamina en la posición 9 de la cadena β y uno o más residuos de aminoácidos adicionales opcionales en una posición dada como se enumeran en el Grupo (A) no están presentes en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente; con la condición de que cuando el TCR manipulado tiene solo un aminoácido alterado que es una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no es R9 de la cadena β; y cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

El TCR manipulado producido por el presente método puede comprender una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β y, opcionalmente, uno o más restos de aminoácidos en una posición dada como se indica en el Grupo (A); en la que la tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β y uno o más residuos de aminoácidos adicionales opcionales en una posición dada como se enumeran en el Grupo (A) no están presentes en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente; con la condición de que cuando el TCR manipulado tiene solo un aminoácido alterado que es una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no es Y10 de la cadena β; y cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

El TCR manipulado producido por el presente método puede comprender una treonina o una serina en la posición 24 de la cadena α y, opcionalmente, uno o más residuos de aminoácidos adicionales en una posición dada como se enumera en el Grupo (A); en la que la treonina o serina en la posición 24 de la cadena α y uno o más residuos de aminoácidos adicionales opcionales en una posición dada como se enumeran en el Grupo (A) no está presente en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente; con la condición de que cuando el TCR manipulado tiene solo un aminoácido alterado que es una treonina o una serina en la posición 24 de la cadena α en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no es T24 de la cadena α; y cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una valina, isoleucina, leucina o una metionina en la posición 19 de la cadena α y, opcionalmente, uno o más residuos de aminoácidos adicionales en una posición determinada como se enumeran en el Grupo (A); en la que la valina, isoleucina, leucina o una metionina en la posición 19 de la cadena α y uno o más residuos de aminoácidos adicionales opcionales en una posición dada como se enumeran en el Grupo (A) no están presentes en la secuencia de aminoácidos del TCR de línea germinal correspondiente; con la salvedad de que cuando el TCR diseñado tiene solo un aminoácido alterado que es una valina, isoleucina, leucina o una metionina en la posición 19 de la cadena α en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, el aminoácido alterado no es V19 de la cadena α; y cuando el TCR tiene dos o más residuos de aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente, al menos uno de los

residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α, una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β, y una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β, con la condición de que uno de los aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente no sea L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; o Y10 de la cadena β.

Sin querer limitarse a la teoría, los presentes inventores consideran que, a modo de ejemplo, un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 96 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 9 de la cadena β; y/o un aminoácido aromático en la posición 10 de la cadena β mejora la interacción entre las regiones variable y constante de las cadenas alfa y beta del presente TCR, respectivamente. Por ejemplo, un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 96 de la cadena α mejora la interacción entre las regiones variable y constante de la cadena alfa y un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 9 de la cadena β; y/o un aminoácido aromático en la posición 10 de la cadena β mejora la interacción entre las regiones variable y constante de la cadena beta.

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una valina, isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α, una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β, y una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β, con la condición de que uno de los aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente no sea V19 de la cadena α; R9 de la cadena β; o Y10 de la cadena β.

El TCR diseñado producido por el presente método puede comprender una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β, y una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β, con la condición de que uno de los aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de la línea germinal correspondiente no son R9 de la cadena β ni Y10 de la cadena β.

El término “uno o más” como se usa en este documento puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más residuos de aminoácidos como se describe en este documento.

El término “dos o más”, como se usa en el presente, puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más residuos de aminoácidos como se describe en este documento.

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

En este documento se describe, el TCR diseñado puede comprender cada uno de los residuos de aminoácidos seleccionados del Grupo (A); con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no sea un residuo de aminoácido especificado para la posición dada en el Grupo (I).

En una realización, el TCR diseñado producido por el presente método puede comprender leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α; una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β; una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β; una treonina o serina en la posición 24 de la cadena α; una valina, isoleucina, leucina o una metionina en la posición 19 de la cadena α; una treonina o serina en la posición 20 de la cadena α; una treonina o serina o una isoleucina, leucina o valina en la posición 50 de la cadena α; una treonina o serina en la posición 5 de la cadena α; una treonina o serina, un ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 8 de la cadena α; una treonina o serina o alanina en la posición 86 de la cadena α; tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 39 de la cadena α; una arginina, lisina o asparagina en la posición 55 de la cadena α; arginina, lisina o una glutamina en la posición 43 de la cadena β; con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no sea un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β.

En una realización, el TCR diseñado producido por el presente método puede comprender leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α; una arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β; una tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β; una treonina o serina en la posición 24 de la cadena α; una valina, isoleucina, leucina o una metionina en la posición 19 de la cadena α; una treonina o serina en la posición 20 de la cadena α; un ácido de treonina o serina o una isoleucina, leucina o valina en la posición 50 de la cadena α; una treonina o serina en la posición 5 de la cadena α; una treonina o serina, un ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 8 de la cadena α; una treonina o serina o alanina en la posición 86 de la cadena α; con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no sea un residuo de aminoácido

especificado para la posición dada seleccionada del grupo de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α.

En una realización, el presente TCR no comprende L96 de la cadena α. En una realización, el TCR no comprende L96 de la cadena α y al menos uno de R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el presente TCR no comprende L96 de la cadena α; R9 de la cadena β e Y10 de la cadena β.

En una realización, el presente TCR no comprende V19 de la cadena α; R9 de la cadena β e Y10 de la cadena β.

En una realización, el presente TCR no comprende R9 de la cadena β. En una realización, el TCR no comprende R9 de la cadena β y al menos uno de L96 de la cadena α; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α

En una realización, el presente TCR no comprende Y10 de la cadena β. En una realización, el TCR no comprende Y10 de la cadena β y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el presente TCR no comprende T24 de la cadena α. En una realización, el TCR no comprende T24 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el presente TCR no comprende V19 de la cadena α. En una realización, el TCR no comprende V19 de la cadena α y al menos uno de L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α.

En una realización, el presente TCR no comprende R9 e Y10 en la cadena β.

En una realización, el presente TCR no comprende cada L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79

de la cadena α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α;

En una realización, el presente TCR no comprende cada L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; y R43 de la cadena β.

En una realización, el presente TCR no comprende cada L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; y S86 de la cadena α.

Sustitución conservadora

Los aminoácidos con propiedades bioquímicas similares pueden definirse como aminoácidos que pueden sustituirse mediante una sustitución conservadora.

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

Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 1 a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

Tabla 1

Alifático	no polar	G A P
		I L V
	Polar – sin carga	C S T M
		N Q
	Polar – con carga	D. E.
		K R
Aromático		H F W Y

En el presente documento se describe la sustitución homóloga (la sustitución y el reemplazo se utilizan aquí para indicar el intercambio de un residuo de aminoácido existente con un residuo alternativo), es decir, sustitución similar, como básica por básica, ácida por ácida, polar por polar, etc.

Un aminoácido alifático no polar puede ser un residuo de glicina, alanina, prolina, isoleucina, leucina o valina.

Un amino alifático polar sin carga puede ser un residuo de cisteína, serina, treonina, metionina, asparagina o glutamina.

Un aminoácido alifático con carga polar puede ser un residuo de ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina.

Un aminoácido aromático puede ser un residuo de histidina, fenilalanina, triptófano o tirosina.

Adecuadamente, se puede realizar una sustitución conservadora entre los aminoácidos en la misma línea en la Tabla 1. De acuerdo con lo anterior, un residuo de aminoácido identificado en una posición dada en el Grupo (I) anterior puede sustituirse con un residuo de aminoácido que represente una sustitución conservadora como se describe en el presente documento.

La glicina, la alanina y la prolina pueden sustituirse como una sustitución conservadora.

La isoleucina, la leucina y la valina pueden sustituirse como sustitución conservadora.

La cisteína, la serina, la treonina y la metionina pueden sustituirse como una sustitución conservadora.

La asparagina y la glutamina se pueden sustituir como una sustitución conservadora.

El ácido aspártico y el ácido glutámico se pueden sustituir como una sustitución conservadora.

La lisina y la arginina pueden sustituirse como una sustitución conservadora.

La histidina, la fenilalanina, el triptófano y la tirosina pueden sustituirse como sustitución conservadora.

La leucina puede sustituirse por una isoleucina o una valina.

La arginina se puede sustituir por una lisina.

La tirosina puede sustituirse por fenilalanina, histidina o triptófano.

La treonina puede sustituirse por una cisteína, una serina o una metionina. Adecuadamente, la treonina puede sustituirse por una serina o una metionina.

La valina puede sustituirse por una isoleucina o leucina.

La metionina puede sustituirse por cisteína, serina o treonina. Adecuadamente, la metionina puede sustituirse por una serina o una treonina.

La glutamina se puede sustituir por una asparagina.

La serina puede sustituirse por una cisteína, una treonina o una metionina.

La serina puede sustituirse por una treonina o metionina.

La fenilalanina se puede sustituir por tirosina, histidina o triptófano.

El ácido aspártico se puede sustituir por un ácido glutámico.

La alanina puede sustituirse por glicina o prolina.

La isoleucina puede sustituirse por leucina o valina.

El ácido glutámico se puede sustituir por un ácido aspártico.

La asparagina se puede sustituir por una glutamina.

La lisina se puede sustituir por una arginina.

Adecuadamente, las sustituciones conservadoras pueden identificarse usando la matriz BLOSUM62. Este sistema proporciona un puntaje para un par de aminoácidos determinado en función de la frecuencia de encontrar una sustitución entre ese par de aminoácidos en proteínas homólogas (ver Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919 (1992)).

En la Figura 19 se muestra una matriz de puntajes BLOSUM62.

Adecuadamente, se puede realizar una sustitución conservadora entre dos aminoácidos cualesquiera que tengan un puntaje BLOSUM62 superior a 0.

Adecuadamente, una leucina puede sustituirse por una isoleucina, valina o metionina.

Adecuadamente, una arginina puede sustituirse con una lisina o glutamina.

Adecuadamente, una tirosina puede sustituirse por una fenilalanina, histidina o triptófano.

Adecuadamente, una treonina puede sustituirse por una serina.

Adecuadamente, una valina puede sustituirse por una isoleucina, leucina o metionina.

Adecuadamente, una metionina puede sustituirse por una isoleucina, leucina o valina.

Adecuadamente, una glutamina puede sustituirse con un ácido glutámico, lisina o arginina.

Adecuadamente, una serina puede sustituirse por una alanina, asparagina o treonina.

Adecuadamente, una fenilalanina puede sustituirse por una tirosina o triptófano.

Adecuadamente, un ácido aspártico puede sustituirse por un ácido glutámico o asparagina.

Adecuadamente, una alanina puede sustituirse por una serina.

Adecuadamente, una isoleucina puede sustituirse por una leucina, valina o metionina.

Adecuadamente, un ácido glutámico puede sustituirse con un ácido aspártico, glutamina o lisina.

Adecuadamente, una asparagina puede sustituirse con un ácido aspártico, histidina o serina.

Adecuadamente, una lisina puede sustituirse por una arginina, ácido glutámico o glutamina.

Secuencia de ácidos nucleicos

La presente invención proporciona además una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor del TCR diseñado como se describe en este documento o una parte del mismo, por ejemplo, la secuencia variable de la cadena α o la cadena β; la cadena α y/o la cadena β.

Como se usa en el presente documento, se pretende que los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” sean sinónimos entre sí.

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

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

El polinucleótido puede ser de cadena doble o sencilla y puede ser ARN o ADN.

El polinucleótido puede tener codones optimizados. Diferentes células difieren en el uso de codones particulares. Este sesgo de codón corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo de célula. Al alterar los codones en la secuencia para que se ajusten a la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión.

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

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

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

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

El polinucleótido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena α y una secuencia de ácido nucleico que es una cadena β unida por una secuencia de autoescisión interna.

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

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

El término “escisión” se usa aquí por conveniencia, pero el sitio de escisión puede hacer que los péptidos se separen en entidades individuales mediante un mecanismo distinto de la escisión clásica. Por ejemplo, para el péptido autoescindible 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (ver más abajo), se han propuesto varios modelos para explicar la actividad de “escisión”: proteolisis por una proteinasa de la célula huésped, autoproteolisis o un efecto de traducción (Donnelly y otros (2001) J. Gen. Virol. 82:1027-1041). El mecanismo exacto de dicha “escisión” no es importante para

los fines de la presente invención, siempre que el sitio de escisión, cuando se coloca entre secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, provoque que las proteínas se expresen como entidades separadas.

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

Vector

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

El término “vector” incluye un vector de expresión, es decir, una construcción capaz de expresión en vivo o in vitro/ex-vivo. También están incluidos los vectores de clonación.

Los sistemas de administración viral incluyen, pero no se limitan a, un vector de adenovirus, un vector viral adenoasociado (AAV), un vector viral del herpes, un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral.

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

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

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

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

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

El vector puede ser un vector retroviral. El vector puede basarse o derivarse del esqueleto del vector MP71. El vector puede carecer de una versión completa o truncada del Elemento de Respuesta a la Hepatitis de la Marmota (WPRE).

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

El aumento del suministro de moléculas CD3 puede aumentar la expresión del TCR en células modificadas genéticamente. Por lo tanto, el vector también puede comprender los genes para CD3-gamma, CD3-delta, CD3-epsilon y/o CD3-zeta. El vector puede comprender simplemente el gen de CD3-zeta. Los genes pueden estar unidos por secuencias de autoescisión, como la secuencia de autoescisión 2A. Como alternativa, se pueden proporcionar uno o más vectores separados que codifican el gen CD3 para la cotransferencia con el (los) vector (es) que codifica (n) TCR.

Célula

La presente invención se refiere además a una célula que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención. La célula puede expresar un receptor de células T de la invención.

La célula puede ser una célula de mamífero, en particular una célula humana.

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

La célula puede ser un linfocito citolítico natural.

La célula puede ser una un linfocito T citolítico natural.

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

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

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

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

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

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

La citoquina puede ser IFNγ y/o IL-2.

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

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

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

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

La célula se puede aislar del sujeto al que se va a transferir adoptivamente la célula modificada genéticamente. A este respecto, la célula puede fabricarse aislando una célula T de un sujeto, activando opcionalmente la célula T, la transferencia del gen TCR ex vivos e inmunoterapia subsiguiente del sujeto por transferencia adoptiva de las células transducidas con TCR.

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

Alternativamente, la célula puede ser, o derivar de, una célula madre, tal como una célula madre hemopoyética (HSC). La transferencia de genes a las HSC no conduce a la expresión del TCR en la superficie celular ya que las células madre no expresan las moléculas CD3. Sin embargo, cuando las células madre se diferencian en precursores linfoides que migran al timo, el inicio de la expresión de CD3 conduce a la expresión superficial del TCR introducido en los timocitos.

Una ventaja de este enfoque es que las células T maduras, una vez producidas, expresan solo el TCR introducido y pocas o ninguna cadena del TCR endógeno, porque la expresión de las cadenas del TCR introducidas suprime la reorganización de los segmentos del gen TCR endógeno para formar genes TCR alfa y beta funcionales.

Otro beneficio es que las células madre modificadas genéticamente son una fuente continua de células T maduras con la especificidad de antígeno deseada. Por tanto, la célula puede ser una célula madre modificada genéticamente que, tras la diferenciación, produce una célula T que expresa un TCR del primer aspecto de la invención. La presente invención también proporciona un método para producir una célula T que expresa un TCR de la invención mediante la inducción de la diferenciación de una célula madre que comprende un polinucleótido de la invención.

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

Composición farmacéutica

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

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

Uso

La presente invención se refiere además a TCR, polinucleótido, vector, célula o composición farmacéutica de la presente invención para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

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

“Prevención” se refiere al uso profiláctico de las células de la presente invención. En este documento, dichas células pueden administrarse a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para prevenir o alterar la causa de la enfermedad o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad. El sujeto puede tener una predisposición a, o se piensa que está en riesgo de desarrollar, la enfermedad.

La presente invención también proporciona el uso de un TCR diseñado; una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención para aumentar la expresión en la superficie celular del TCR, en el que el uso no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

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

Método de tratamiento

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

El método puede incluir las etapas de:

(i) aislar una muestra que contenía células;

(ii) transducir o transfectar dichas células con una secuencia de ácido nucleico o un vector proporcionado por la presente invención;

(iii) administrar las células de (ii) a un sujeto.

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

Se describe en este documento, el sujeto de cualquiera de los métodos descritos en este documento es un mamífero, preferiblemente un gato, perro, caballo, burro, oveja, cerdo, cabra, vaca, ratón, rata, conejo o conejillo de Indias, pero más preferiblemente el sujeto es un humano.

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

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

Enfermedad

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

Por ejemplo, la enfermedad a tratar y/o prevenir mediante los usos de la presente invención puede ser una enfermedad cancerosa, como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células

renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

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

Método

La presente invención proporciona un método para aumentar la expresión en la superficie celular de un TCR como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con lo anterior, el TCR alterado generado mediante la alteración de uno o más aminoácidos como se define en la etapa (iii) es un TCR diseñado como se menciona en este documento.

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

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

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

La secuencia de aminoácidos del TCR puede alterarse de modo que comprenda uno o más residuos de aminoácidos como se definió anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de un TCR se puede alterar utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del TCR puede alterarse por mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica el TCR.

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

La expresión en la superficie celular de un TCR puede determinarse al utilizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

La presente invención se refiere además a un método para seleccionar un TCR que, cuando se expresa en una célula, tiene un alto nivel de expresión en la superficie celular como se define en las reivindicaciones.

El método puede comprender la etapa de seleccionar un TCR que comprende uno o más residuos de aminoácidos como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la fuerza de un TCR como se define en las reivindicaciones.

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

El método puede comprender determinar el residuo de aminoácido presente en una o más posiciones como se describe en este documento.

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

En el presente documento se describe un método para identificar residuos de aminoácidos que influyen en el nivel de expresión de la superficie celular de un TCR exógeno, que comprende las etapas de:

(i) comparar los niveles de expresión de la superficie celular de una pluralidad del TCR con un TCR de referencia;

(ii) determinar los TCR de la pluralidad del TCR que tienen (a) un nivel bajo de expresión en la superficie celular en comparación con el TCR de referencia o (b) un nivel similar o alto de expresión en la superficie celular en comparación con el TCR de referencia;

(iii) comparar las secuencias de aminoácidos entre los TCR seleccionados en el grupo (a) y el grupo (b) en la etapa (ii) para identificar los residuos de aminoácidos que influyen en el nivel de expresión del TCR en la superficie celular cuando se expresa en una célula.

Convenientemente, el método se usa para identificar residuos de aminoácidos que están asociados con un alto nivel de expresión en la superficie celular de un TCR exógeno. Aquí, los residuos de aminoácidos que están predominantemente presentes en los TCR seleccionados en el grupo (b) en la etapa (ii) pueden determinarse asociados con una alta expresión en la superficie celular de un TCR exógeno.

Convenientemente, el método se usa para identificar residuos de aminoácidos que están asociados con un bajo nivel de expresión en la superficie celular de un TCR exógeno. En este documento, se puede determinar que los residuos de aminoácidos que están predominantemente presentes en los TCR seleccionados en el Grupo (a) en la etapa (ii) están asociados con una baja expresión en la superficie celular de un TCR exógeno.

Las secuencias de aminoácidos de los TCR pueden determinarse usando métodos que son conocidos en la técnica, por ejemplo, usando métodos de clonotipado como los descritos en Hodges et al. y Zhou et al. (ambos como arriba) y como se ejemplifica en el presente Ejemplo 2.

La expresión de los TCR en la superficie celular se puede comparar utilizando métodos que son conocidos en la técnica, como los descritos en el presente documento. Por ejemplo, la expresión de la superficie celular de un TCR puede determinarse usando citometría de flujo. En particular, la expresión de la superficie celular de un TCR puede determinarse usando citometría de flujo con un anticuerpo detectable que se une específicamente al TCR de referencia y/o al TCR endógeno.

La pluralidad del TCR puede ser una pluralidad del TCR endógenos expresados en una población de células. Las células pueden ser, por ejemplo, células T CD4+ o CD8+ o células NKT. Las células pueden ser células de mamífero, preferiblemente células humanas que expresan TCR humanos endógenos.

El TCR de referencia se puede coexpresar como un TCR exógeno en una población de células que comprende la pluralidad del TCR.

Un TCR de la pluralidad del TCR que tiene un bajo nivel de expresión en la superficie celular en comparación con el TCR de referencia puede no ser detectable en la superficie celular cuando el TCR de referencia se coexpresa en la misma célula.

Un TCR de la pluralidad del TCR que tiene un nivel similar o alto de expresión en la superficie celular en comparación con el TCR de referencia puede detectarse en la superficie celular cuando el TCR de referencia se coexpresa en la misma célula.

El TCR de referencia tiene una estructura que permite distinguir la expresión en la superficie celular del TCR de referencia de la expresión en la superficie celular de la pluralidad del TCR. Por ejemplo, el TCR de referencia puede comprender diferentes aminoácidos, dominios y/o motivos que permiten distinguir la expresión en la superficie celular del TCR de referencia de la expresión en la superficie celular de uno o más de la pluralidad del TCR. Por ejemplo, el TCR de referencia puede comprender diferentes aminoácidos, dominios y/o motivos que son detectables usando un anticuerpo diferente durante la citometría de flujo. Por ejemplo, el TCR de referencia puede contener etiquetas como Myc y/o V5 que son reconocidas por anticuerpos contra estas etiquetas (por ejemplo, consulte La Figura 4). Adecuadamente, el TCR de referencia puede comprender un dominio constante diferente a la pluralidad del TCR. Por ejemplo, si la pluralidad del TCR comprende un dominio constante humano, el TCR de referencia puede comprender un dominio constante no humano, por ejemplo, un dominio constante de murino o de conejo. El dominio constante de murino puede ser un dominio constante de murino.

El TCR de referencia puede ser específico para cualquier antígeno o el TCR de referencia puede tener una especificidad desconocida. Convenientemente, el TCR de referencia puede no ser un TCR específico para WT1 (tumor de Wilms 1). Convenientemente, un TCR WT1 es un TCR que se une específicamente a un antígeno peptídico de la proteína WT1.

Adecuadamente, el método no identifica L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; T20 de la cadena α; M50 de la cadena α; T5 de la cadena α; Q8 de la cadena α; S86 de la cadena α; F39 de la cadena α; D55 de la cadena α; R43 de la cadena β; A66 de la cadena α; V19 de la cadena β; L21 de la cadena β; L103 de la cadena β; T3 de la cadena α; S7 de la cadena α; P9 de la cadena α; M11 de la cadena α; A16 de la cadena α; T18 de la cadena α; L21 de la cadena α; S22 de la cadena α; D26 de la cadena α; F40 de la cadena α; S47 de la cadena α; R48 de la cadena α; Q49 de la cadena α; I51 de la cadena α; L52 de la cadena α; V53 de la cadena α; T67 de la cadena α; E68 de la cadena α; N74 de la cadena α; F76 de la cadena α; N79 de la cadena

α; Q81 de la cadena α; A83 de la cadena α; K90 de la cadena α; S92 de la cadena α; D93 de la cadena α; y M101 de la cadena α como residuos de aminoácidos que aumentan la expresión del TCR en la superficie celular.

En el presente documento se describe un método para aumentar la dimerización de las cadenas α y β del TCR que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;

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

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

(iii) alterar el residuo de aminoácido en una o más de las posiciones enumeradas en la etapa (ii) a un residuo de aminoácido seleccionado entre: un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 96 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 9 de la cadena β; un aminoácido aromático en la posición 10 de la cadena β; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 24 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 20 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o una isoleucina, leucina o valina en la posición 50 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 5 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, un ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 8 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 86 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 39 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 55 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 43 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 66 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 19 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena β; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 103 de la cadena β; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 3 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 7 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar en la posición 9 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una isoleucina, leucina o valina en la posición 11 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 16 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 18 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 21 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 22 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 26 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 40 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 47 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 48 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 49 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 51 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 52 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una metionina en la posición 53 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga en la posición 67 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 68 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 74 de la cadena α; un aminoácido aromático en la posición 76 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o un ácido aspártico o histidina en la posición 79 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 81 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una serina en la posición 83 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o una glutamina en la posición 90 de la cadena α; un aminoácido alifático polar sin carga o alanina en la posición 92 de la cadena α; un aminoácido alifático con carga polar o asparagina en la posición 93 de la cadena α; un aminoácido alifático no polar o una isoleucina, leucina o valina en la posición 101 de la cadena α.

Adecuadamente, las cadenas α y β del TCR a alterar por dicho método para aumentar la dimerización de las cadenas α y β del TCR son de un TCR soluble (sTCR). Los sTCR normalmente comprenden los dominios variables del TCR y al menos parte del dominio constante, pero carecen del dominio transmembrana y del dominio citoplásmico intracelular. Convenientemente, el sTCR del presente método comprende (i) la totalidad o parte de una cadena α del TCR, excepto el dominio transmembrana de la misma, y (ii) la totalidad o parte de una cadena β del TCR, excepto el dominio transmembrana por lo tanto, en el que (i) y (ii) cada uno comprende un dominio variable funcional y al menos una parte del dominio constante del TCR. Adecuadamente, un sTCR del presente método no comprende un dominio transmembrana. Por lo tanto, el sTCR no está anclado en la superficie de la célula. Adecuadamente, la cadena α y la cadena β de sTCR pueden comprender todo el dominio de Ig constante extracelular de la cadena del TCR. Adecuadamente, la cadena α y la cadena β de sTCR pueden comprender todo el dominio extracelular de la cadena del TCR.

Convenientemente, las cadenas α y β del TCR que se van a alterar mediante dicho método para aumentar la dimerización de las cadenas α y β del TCR son de un TCR unido a membrana y el método comprende la condición de que cuando solo se altera un aminoácido en la etapa (iii) el el aminoácido alterado no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I):

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

cuando se alteran dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (iii) al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I).

También se proporciona un TCR o un sTCR de acuerdo con el método para aumentar la dimerización de las cadenas α y β del TCR descrito anteriormente.

Dicho método puede mejorar el rendimiento de expresión del TCR en la superficie celular o del sTCR que la célula excreta como proteína soluble.

Producto de programa de ordenador

La Figura 12 ilustra esquemáticamente un dispositivo 100 informático de propósito general del tipo que puede usarse para implementar las técnicas descritas anteriormente. En el contexto de la presente invención, esto podría ser, por ejemplo, un procesador integrado que forme parte de un sistema más grande. El dispositivo 100 informático de propósito general incluye una unidad 102 central de procesamiento, una memoria 104 de acceso aleatorio y una memoria 106 de solo lectura, conectadas entre sí a través del bus 122. También comprende además una tarjeta 108 de interfaz de red, una unidad 110 de disco duro, un controlador 112 de pantalla y un monitor 114 y un circuito 116 de entrada/salida de usuario con un teclado 118 y un ratón 120, todos conectados a través del bus 122 común. En funcionamiento, como cuando forma parte de un sistema más grande, la unidad 102 central de procesamiento ejecutará instrucciones de programas informáticos que pueden, por ejemplo, almacenarse en la memoria 104 de acceso aleatorio y/o en la memoria 106 de solo lectura. Las instrucciones del programa podrían recuperarse adicionalmente desde la unidad 110 de disco duro o descargarse dinámicamente a través de la tarjeta 108 de interfaz de red. Los resultados del procesamiento realizado pueden mostrarse a un usuario o a un ingeniero a través de un controlador 112 de pantalla y un monitor 114 conectados. Las entradas del usuario para controlar el funcionamiento del dispositivo 100 informático de propósito general pueden recibirse a través de un circuito 116 de salida de entrada del usuario conectado desde el teclado 118 o el ratón 120. Se apreciará que el programa informático podría escribirse en una variedad de diferentes lenguajes informáticos. El programa informático puede almacenarse localmente en un medio de grabación o descargarse dinámicamente al dispositivo 100 informático de propósito general. Cuando funciona bajo el control de un programa informático apropiado, el dispositivo 100 informático de propósito general puede realizar las técnicas descritas anteriormente y puede considerarse que forma un aparato para realizar cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. La arquitectura del dispositivo 100 informático de propósito general podría variar considerablemente y la Figura 13 es solo un ejemplo. El dispositivo 100 informático de propósito general también puede tener una configuración que le permita proporcionar un entorno de ejecución de instrucciones (es decir, una máquina virtual).

Esta divulgación no está limitada por los métodos y materiales ejemplares divulgados en el presente documento, y cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de esta divulgación. Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango también se divulga específicamente. Cada rango más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido se incluye dentro de esta divulgación. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse de forma independiente en el rango, y cada rango en el que ninguno de los límites o ambos están incluidos en los rangos más pequeños también se incluye dentro de esta divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en esta divulgación.

Debe señalarse que tal como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno, una” y “el, la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto por”, tal como se utilizan en este documento, son sinónimos de “incluido”, “incluye” o “que contiene”, “contiene” y son incluyentes o abiertos y no excluyen información adicional, elementos no mencionados, elementos o etapas del método. Los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto por” también incluyen el término “que consiste en”.

Las publicaciones discutidas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que dichas publicaciones constituyen un estado de la técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, que pretenden ayudar a los expertos en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención.

Ejemplos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Expresión del TCR fuerte y débil en un entorno no competitivo

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

Expresión del TCR fuerte y débil en un entorno competitivo

Las células Jurkat que expresan el TCR WT1 modificado se transdujeron con vectores pMP71 que codifican los TCR fuertes o débiles genéricos. 72 horas después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, V5 Tag y Myc Tag (Figura 6). Las células Jurkat se controlaron con una alta expresión de CD19 y se seleccionaron la expresión de V5 Tag y Myc Tag. El MFI de V5 Tag y Myc Tag también se determinó para las células de alta expresión de CD19.

Expresión del TCR fuerte y débil en células Jurkat que expresan expresión baja, media y alta del TCR WT1 modificado

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

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

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

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

Ejemplo 4 - Ingeniería del TCR de expresión fuerte y expresión débil

Para diseñar el TCR de expresión fuerte con residuos débiles, el TCR fuerte se usó como estructura principal y todos los residuos fuertes que se suponía que eran importantes en la fuerza del TCR se reemplazaron con los residuos del TCR débil en la posición correspondiente.

Para diseñar el TCR débil con residuos fuertes, el TCR débil se usó como estructura principal y todos los residuos fuertes que se suponía que eran importantes en la fuerza del TCR se reemplazaron con residuos del TCR débil en la posición relevante.

Las células Jurkat sin TCR (fila superior) y las células Jurkat que expresan el TCR murinizado WT1 (fila inferior) se transdujeron con el TCR indicado y 72 horas más tarde se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, V5 Tag y Myc Tag. Las células Jurkat se controlaron con una alta expresión de CD19 y se determinó la expresión de V5 Tag y Myc Tag. El MFI de V5 Tag y Myc Tag también se determinó para las células de alta expresión de CD19+ (Figura 9).

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

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

El TCR débil genérico se usó como estructura principal y la técnica de mutagénesis de PCR de cambio rápido se usó para hacer una serie del TCR que tenían solo uno de los residuos fuertes previstos que reemplazaba el residuo del TCR débil en la posición relevante mientras conservaba el resto de la estructura principal TCR débil.

Los TCR mutados se marcan de modo que la letra represente el aminoácido, el número sea la posición en el marco del TCR y el α o β indique si el residuo está en la cadena alfa o en la cadena beta. La última gráfica, fila inferior, lado derecho tiene 3 cambios de residuos, V19 en la cadena alfa y R9, Y10 en la cadena beta (Figuras 10 y 11).

Se transdujeron células Jurkat sin TCR (Figura 10) y células Jurkat que expresan el TCR WT1 modificado (Figura 11), con el retrovirus pMP71 que codifica el TCR indicado. 72 horas después de la transducción, las células transducidas se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, V5 Tag y Myc Tag. Las células se controlaron con una alta expresión de CD19 y se determinó la expresión de la V5 Tag y la Myc Tag.

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

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

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

Expresión de la superficie celular en células Jurkat

Las células Jurkat (que no contienen cadenas TCR alfa o beta endógenas) se transdujeron con vectores pMP71 que codifican CMV de tipo silvestre o TCR WT1 no modificados, o los mismos TCR que se mutaron para contener L96α, R9β y Y10β. 72 horas después de la transducción, las células Jurkat se tiñeron con Abs anti-CD19 y tetrámeros de CMV o Abs Vβ2.1 (para determinar la expresión beta variable de WT1).

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

Expresión de la superficie celular en células T primarias

Las células T primarias activadas se transdujeron con vectores pMP71 que codifican CMV de tipo silvestre o TCR WT1 no modificados, o los mismos TCR que se mutaron para contener L96α, R9β e Y10β. 72 h después de la transducción, las células T se tiñeron con Abs anti-CD3, CD8 y CD19 y tetrámero de CMV o Abs Vβ2.1. Las células se seleccionaron en células T altas CD3+ y CD19, y luego se determinó la expresión del TCR usando tetrámeros o anticuerpos anti-vβ2.1 para detectar CMV- y WT1-TCR, respectivamente (Figura 15).

Las células T primarias activadas se transdujeron con vectores pMP71 que codifican CMV de tipo silvestre no modificado o el mismo TCR mutado para contener L96α, R9β y Y10β. 5 días después de la transducción, las células T se cocultivaron con APC que expresaban el péptido pCMV o el péptido irrelevante pWT235. Después de 18 h de cocultivo, se recogió el sobrenadante y se determinó la producción de IL-2 e IFN-γ mediante ELISA (Figura 16).

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

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

El nivel de ARNm de α/β fue similar para todos los TCR analizados y no se correlacionó con los niveles de expresión de superficie del TCR muy diferentes (Figura 23A). Por ejemplo, un d->weakTCR convertido no fue detectable en la superficie celular a pesar de la expresión eficaz del ARNm.

Se usó microscopía confocal para comparar el nivel de proteína intracelular con alta expresión superficial del TCR (w->domTCR) y baja expresión superficial (d-weakTCR). Se usaron anticuerpos independientes de la conformación específicos para la etiqueta V5 para evaluar la cantidad de proteína de cadena α intracelular independientemente del plegamiento y emparejamiento del TCR. La transducción de células Jurkat con ambos TCR demostró la presencia de proteína intracelular (Figura 23B). La cuantificación de células individuales de los datos confocales indicó una correlación entre la intensidad de la tinción de CD19 y TCR y sugirió que la cantidad de cadena α era ligeramente mayor para el TCR con expresión superficial eficiente en comparación con el TCR sin expresión superficial (Figura 9C).

Sin embargo, la comparación del perfil TCR/CD19 confocal y el perfil de expresión de la superficie celular determinado por citometría de flujo (Figura 23D), demostró que la falta del TCR en la superficie celular no estaba causada por la falta de proteína TCR intracelular. Esto indica que el plegado de proteínas deficiente y el ensamblaje del TCR ineficaz fue una de las causas principales de la expresión deficiente del TCR d->débil y se superó mediante el uso de residuos de aminoácidos dominantes como se identifica en el presente documento.

Ejemplificación adicional de la influencia de L96α, R9β e Y10β en la expresión de la superficie celular del TCR

Se investigaron dos TCR débiles adicionales (débil 2 y 3) para determinar el impacto de la introducción de L96α, R9β e Y10β en el nivel de expresión de la superficie celular. El porcentaje de células que expresan TCR y el MFI de expresión en la superficie celular aumentó para cada TCR débil después de la introducción de L96α, R9β e Y10β (ver Figura 20).

Además, la expresión en la superficie celular de cuatro TCR específicos de antígeno (CMV2, HA1.m2, HA1.m7, HA2.19) se mejoró con la introducción de solo tres cambios de aminoácidos (L96α, R9β y Y10β) (consulte las Figuras 21 y 22).

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

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

Ejemplo 8 - Mapeo de residuos identificados como importantes en los niveles de expresión de la superficie celular

Se utilizó el modelado estructural del TCR para determinar cómo los residuos en el marco de la región variable pueden afectar la estabilidad del TCR. En particular, se determinó el mecanismo molecular por el cual los cambios de aminoácidos en un TCR pobremente expresado (débil) dieron como resultado una expresión superficial mejorada. El TCR débil que se probó más extensamente en el presente experimento consistió en TRAV13-2 y TRBV7-3 (ver Figura 24). Dado que la estructura de la cadena TRAV13-2 aún no se ha determinado, el modelado utilizando TRAV13-1 (código PDB 3PL6, Sethi y col.; 2011; J Exp Med; 208; 91-102), que está estrechamente relacionado con TRAV13-2. La estructura del TCR 3PL6 consta de la cadena TRAV13-1 emparejada con TRBV7-3, la misma cadena que el presente TCR débil. 14 de los residuos de dominio variable que se analizaron en el presente estudio se mapearon en la estructura TCR débil (Figura 25A).

El cambio de P96α a L96α resultó en un aumento de 3 veces en la expresión del TCR (Fig. 4). Este residuo sobresale de la hélice corta que precede a la hebra F y se empaqueta contra el dominio Cα. El modelado de L96α en TRAV13-1 revela interacciones de empaquetamiento hidrófobo adicionales con residuos no polares de la interfaz Cα (por ejemplo, V161α y P112α) en relación con TCR débil (Fig. 25b). Por lo tanto, la expresión del TCR mejorada lograda con L96α probablemente se deba a la estabilidad mejorada de la interfaz Vα-Cα. Las sustituciones en las posiciones 9 y 10 de la cadena β también mejoraron la expresión del TCR (Fig. 4). En TRBV7-3, los residuos S9β y N10β median interacciones mínimas en la interfaz Vβ-Cβ (Fig. 25c). Modelar el reemplazo de S9β con R9β muestra que podría formar un puente salino potencial con el vecino E159β (dominio Cβ) (Fig. 25c). Además, se prevé que Y10β forme interacciones de apilamiento con residuos que sobresalen del dominio Cβ (Y218β y H157β), lo que probablemente aumente la estabilidad de la interfaz Vβ-Cβ en relación con el TRBV7-3 nativo (Fig. 25c). Por lo tanto, la expresión mejorada del TCR lograda por la introducción de R9β e Y10β probablemente se deba a la mayor estabilidad de las interacciones Vβ-Cβ. El efecto positivo de V19α en la expresión del TCR puede explicarse por su protrusión desde la hebra B hacia el núcleo hidrófobo. Reemplazar S19α con V19α muestra que la cadena lateral de valina podría estabilizar el núcleo hidrófobo mediando múltiples interacciones no polares con L11α (hebra A), V13α (hebra A), I21α (hebra B) e I91α (hebra E) (Fig. 25d). Por lo tanto, la sustitución de V19α mejora la estabilización del núcleo hidrófobo del dominio Vα. Finalmente, A24α es un residuo expuesto al solvente que sobresale de la cadena B. Modelar el reemplazo de A24α con T24α sugiere que es probable que este residuo medie una interacción de enlace de hidrógeno con el nitrógeno del anillo de imidazol de H86α (hebra E) (Fig. 25e). Por lo tanto, la generación de un nuevo enlace de hidrógeno puede proporcionar una explicación molecular de la expresión mejorada del TCR mediada por T24α (Fig. 4).

De acuerdo con su posición dentro de la estructura 3D, los residuos identificados se agruparon ampliamente en cuatro clases de residuos que difieren entre los dominios TCR V débiles y fuertes:

1. Disolvente expuesto (posibles efectos sobre el plegado)

2. Residuo en el núcleo hidrófobo del dominio (probablemente afecte la estabilidad del dominio V)

3. Residuo en la interfaz entre los dominios Vα y Vβ (es decir, potencialmente involucrado en interacciones entre cadenas)

4. Residuo en la interfaz entre el dominio V y C de una sola cadena (es decir, potencialmente involucrado en las interacciones dentro de la cadena)

Por ejemplo:

Clase de residuos	Ejemplos de residuos
1	T5α / Q8α / T20α / T24α / R55α / A66α / S86α
2	V19α / L39α / M50α / Q43β
3	M50α / R55α
4	L96α / R9α / Y10α

Los residuos identificados afectan las características estructurales del TCR. Por lo tanto, se espera que los residuos conservados con propiedades similares tengan efectos estructurales similares. En particular, se espera que los residuos encontrados en proteínas homólogas con función conservada de acuerdo con lo definido por la puntuación de Blosum62 tengan efectos similares en la fuerza del TCR.

Por ejemplo, los residuos L96α, R9α e Y10α afectan la interfaz entre el dominio V y C. Como se ejemplifica aquí (ver el Ejemplo 6), estos tres residuos mejoran consistentemente la expresión superficial del TCR. Por lo tanto, también se espera que los aminoácidos conservados y los aminoácidos respectivos con un puntaje de Blosum62 superior a 0 mejoren la expresión del TCR.

Los datos de modelado anteriores indicaron que las interacciones eficientes entre los dominios variable y constante en la cadena α y β fueron particularmente importantes para la expresión de alto nivel. Por lo tanto, utilizamos 8 TCR diferentes para probar si la mejora de la interacción variable/constante mejoró de manera constante la expresión de los TCR, independientemente del uso y la especificidad de la región V. Los datos mostraron que la combinación de L96α, R9β y Y10β efectivamente mejoró la expresión de todos los TCR probados (Fig. 26a, b). De acuerdo con informes anteriores, el CMV2-TCR de tipo silvestre fue un caso extremo de un TCR pobremente expresado que era indetectable en la superficie celular, que era similar al perfil observado cuando el TCR dominante se convirtió en el d->weakTCR pobremente expresado (Fig. 2d). La triple modificación LRY del CMV2-TCR dio como resultado una expresión superficial, aunque a niveles más bajos que los otros TCR. La comparación de todos los TCR de tipo silvestre y modificados con LRY indicó que el reemplazo de tres aminoácidos aumentó consistentemente la expresión superficial en células Jurkat en aproximadamente 3 veces (Fig. 26 a, b), independientemente de la presencia o ausencia del TCR endógeno. A continuación, analizamos en detalle la expresión y función de 4 TCR específicos de antígeno (específicos para CMV y antígenos menores de histocompatibilidad HA1 y HA2) en células T humanas primarias. La presencia de las V5 Tag y Myc Tag proporcionó una poderosa herramienta para distinguir las cadenas del TCR introducidas del TCR humano endógeno. Más importante aún, el perfil de tinción de V5/myc nos permitió identificar células T positivas dobles que expresan ambas cadenas TCR introducidas y también células T positivas individuales que expresan solo una de las cadenas introducidas emparejadas incorrectamente con una cadena TCR endógena. Curiosamente, existe una clara correlación entre el nivel de expresión del TCR en células Jurkat (Fig. 26a) y la frecuencia de células T humanas primarias que expresan ambas cadenas del TCR (Fig. 26c). Por ejemplo, el TCR HA1m7 no modificado se expresa pobremente en las células Jurkat y muestra altos niveles de emparejamiento erróneo en las células T primarias, ya que el 41 % de las células expresan solo la cadena α introducida, el 12 % solo la cadena β y el 24 % ambas cadenas α y cadenas β. El análisis de los cuatro TCR mostró que la modificación LRY aumentó la frecuencia de las células T primarias que expresan ambas cadenas del TCR desde un rango de 24-58 % a 57-85 %. Para el TCR HA2.19 modificado con LRY, que se expresa más fuertemente en células Jurkat, la mayoría de las células T primarias expresaron ambas cadenas del TCR introducidas en la superficie celular.

Ejemplo 9 - Demostración de la expresión en la superficie celular con otros residuos de aminoácidos

Las clasificaciones de Blosum62 se utilizaron para determinar los aminoácidos conservados para un subconjunto de los residuos fuertes previamente identificados. Se generó una serie de construcciones del TCR usando mutagénesis QuikChange, usando el TCR débil genérico descrito en este documento como plantilla de ADN.

Las construcciones se transfectaron en células Phoenix-Ampho y se realizó la transducción en células Jurkat que (i) no tienen o (ii) tienen un TCR endógeno. Se realizó la expresión de cada TCR en células Jurkat con/sin TCR endógeno, usando los residuos de aminoácidos fuertes identificados originalmente para la comparación. Los resultados mostrados en la Figura 27 demuestran que al menos sustituciones conservadoras en la posición 5, 96 y 19 de la cadena alfa y la posición 10 de la cadena beta recapitularon la mayor expresión proporcionada por el aminoácido dominante original en la misma posición.

Ejemplo 10 - Comparación de los efectos de las modificaciones C=C y las modificaciones presentes en los niveles de expresión del TCR

Se muestra un esquema de construcciones del TCR que contienen la modificación C=C, la modificación de dominancia (modificada para incluir leucina en la posición 96 de la cadena α; arginina en la posición 9 de la cadena β; y tirosina en la posición 10 de la cadena β) o ambas en la Figura 28. Todas estas modificaciones se probaron en tres TCR: TCR débil genérico, CMV-TCR y HA1m7-TCR en células Jurkat humanas que no expresan un TCR endógeno. La eficacia de la transducción medida por el porcentaje y el MFI de la expresión de CD19 y las células altas en CD19 seleccionadas se analizaron para determinar los niveles de expresión del TCR (Figura 29-31).

Los datos indican que la modificación LRY es más eficaz que la modificación C=C para potenciar la expresión de la cadena alfa/beta del TCR humano en células Jurkat con o sin TCR endógeno.

REIVINDICACIONES

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

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;

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

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; y

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

leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α;

arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β;

tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β;

treonina o serina en la posición 24 de la cadena α;

valina, isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α;

en el que los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT), y con la condición de que cuando solo se altera un aminoácido en la etapa (iii) el aminoácido alterado generado no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I):

(I) L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; y

cuando se alteran dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (iii) al menos uno de los residuos de aminoácidos alterados generados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I).

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

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR;

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

96 de la cadena α; 9 de la cadena β; 10 de la cadena β; 24 de la cadena α; 19 de la cadena α; y

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

isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α;

lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β;

fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β;

serina en la posición 24 de la cadena α;

isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α,

en el que los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con la IMGT.

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

(i) proporcionar una o más secuencias de cadena α y/o cadena β del TCR; y

(ii) seleccionar una secuencia de aminoácidos del TCR que comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de:

leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α;

arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β;

tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β;

treonina o serina en la posición 24 de la cadena α;

valina, isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α;

en el que los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con la IMGT, y con la condición de que cuando solo se selecciona un aminoácido en la etapa (ii), el aminoácido no consta de un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I):

(I) L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; y

cuando se seleccionan dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (ii), al menos uno de los residuos de aminoácidos seleccionados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I).

4. Un método para determinar la fuerza de un TCR que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia de cadena α y/o cadena β del TCR; y

(ii) determinar si la secuencia del TCR comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de:

leucina, isoleucina, valina o metionina en la posición 96 de la cadena α;

arginina, lisina o glutamina en la posición 9 de la cadena β;

tirosina, fenilalanina, histidina o triptófano en la posición 10 de la cadena β;

treonina o serina en la posición 24 de la cadena α;

valina, isoleucina, leucina o metionina en la posición 19 de la cadena α;

en el que los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con la IMGT, y en el que se determina que una secuencia que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos enumerados es un TCR de alta expresión y se determina una secuencia que no comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos enumerados que es un TCR de baja expresión;

con la condición de que cuando solo se selecciona un aminoácido en la etapa (ii), el aminoácido no consiste en un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I):

(I) L96 de la cadena α; R9 de la cadena β; Y10 de la cadena β; T24 de la cadena α; V19 de la cadena α; y

cuando se seleccionan dos o más residuos de aminoácidos en la etapa (ii), al menos uno de los residuos de aminoácidos seleccionados no es un residuo de aminoácido especificado para la posición dada seleccionada del grupo (I).

5. Un polinucleótido que codifica una cadena α y/o una cadena β del TCR como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, preferiblemente en el que dicho polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica una cadena α y un polinucleótido que codifica una cadena β unida por una secuencia de autoescisión interna o un sitio interno de entrada al ribosoma.

6. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, preferiblemente en el que el vector es un vector de retrovirus, un vector de lentivirus o un transposón.

7. Una célula que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6, preferiblemente en la que la célula es una célula T, un linfocito citolítico natural o una célula madre, más preferiblemente en la que la célula se deriva de una célula T, un linfocito citolítico natural o una célula madre aislada de un sujeto.

8. Una composición farmacéutica que comprende un TCR como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o una célula de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Un TCR como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un polinucleótido, vector, célula o composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 8 para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

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

11. Un producto de programa informático en el que se almacena un programa informático de forma no transitoria, que cuando se ejecuta en un dispositivo de procesamiento hace que el dispositivo de procesamiento lleve a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. Uso de un TCR diseñado como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2; un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6 para aumentar la expresión en la superficie celular del TCR, en el que el uso no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

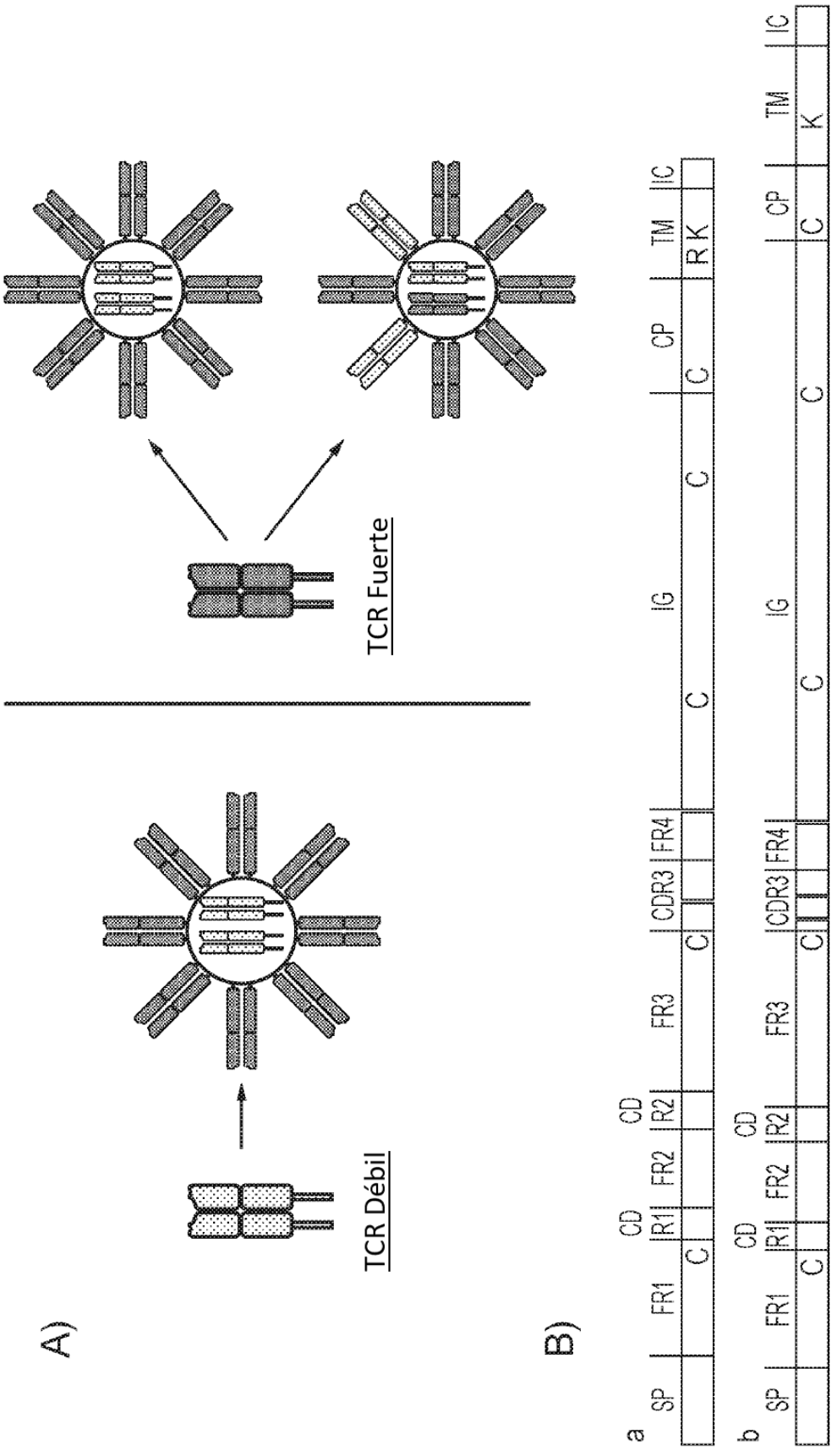

A)
TCR Débil
TCR Fuerte
B)
a
SP
FR1
CD
R1
FR2
CD
R2
FR3
C
CDR3
FR4
IG
C
C
CP
C
TM
R K
IC
b
SP
FR1
CD
R1
FR2
CD
R2
FR3
C
CDR3
FR4
IG
C
C
CP
C
TM
K
IC

FIG. 1

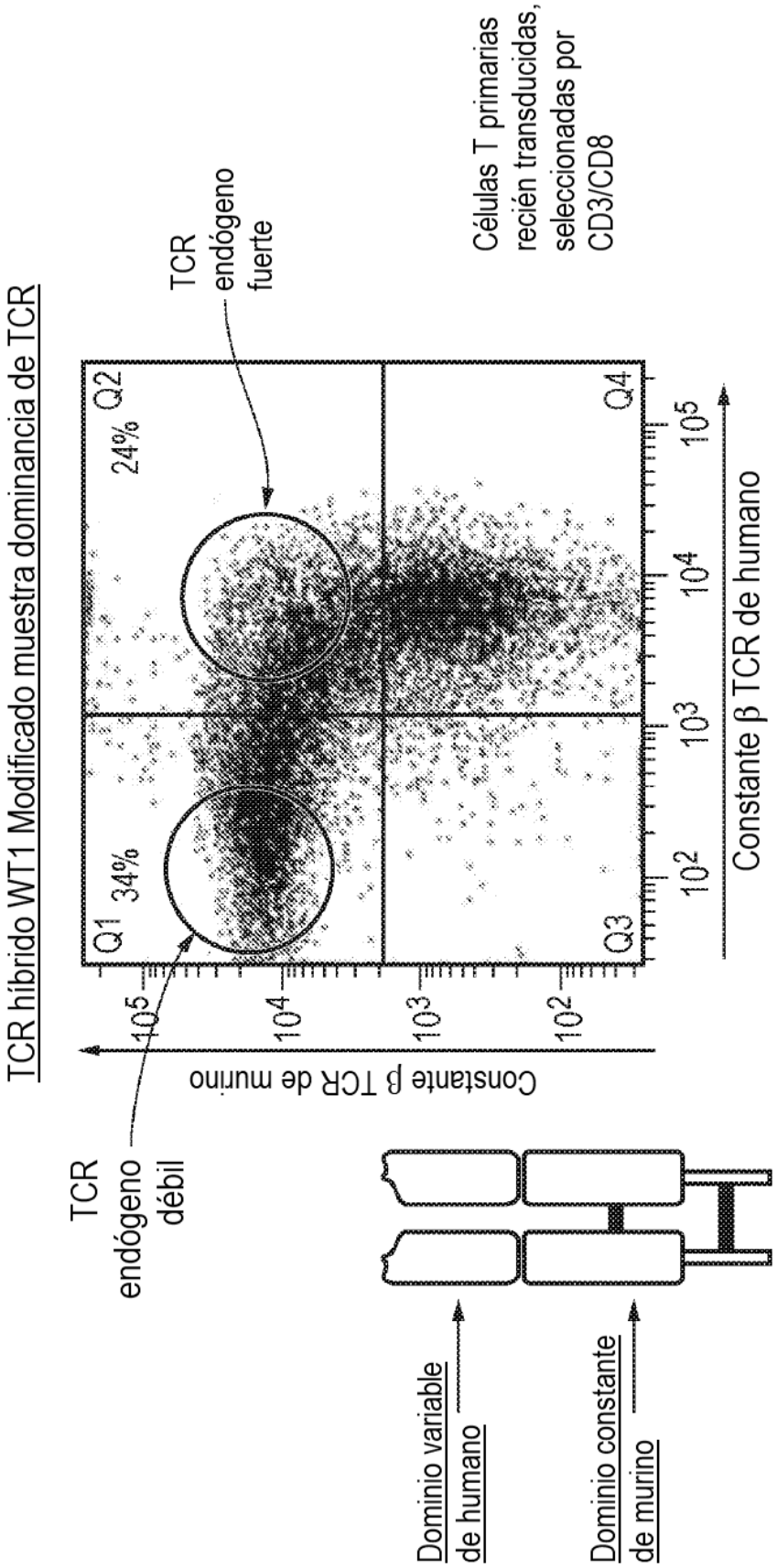

TCR híbrido WT1 Modificado muestra dominancia de TCR
Células T primarias recién transducidas, seleccionadas por CD3/CD8
TCR endógeno fuerte
TCR endógeno débil
Q1 34%
Q2 24%
Q3
Q4
Constante β TCR de murino
Constante β TCR de humano
Dominio variable de humano
Dominio constante de murino

FIG. 2

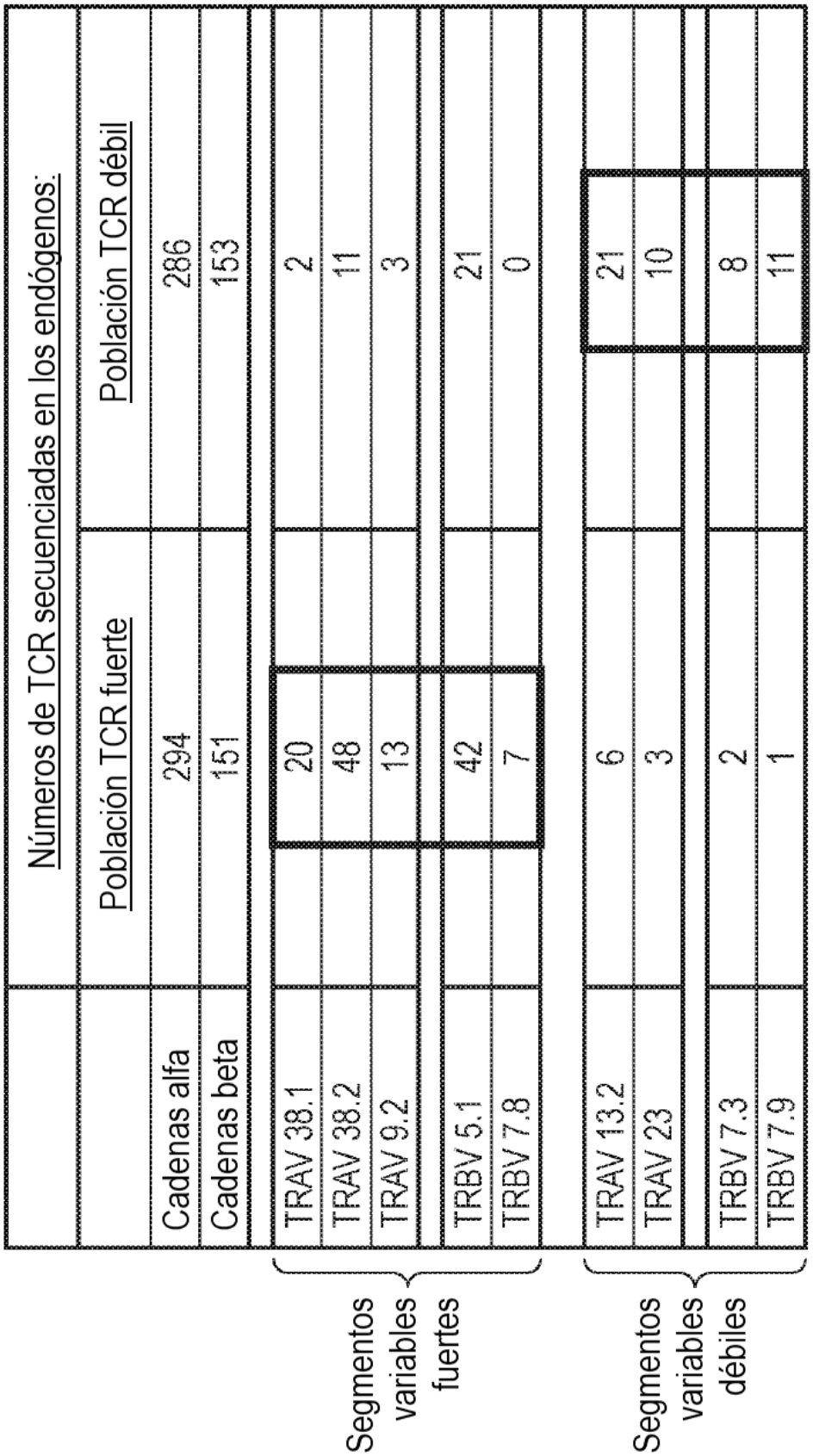

Números de TCR secuenciadas en los endógenos:
Población TCR fuerte
Población TCR débil
Cadenas alfa
294
286
Cadenas beta
151
153
TRAV 38.1
20
2
TRAV 38.2
48
11
TRAV 9.2
13
3
TRBV 5.1
42
21
TRBV 7.8
7
0
TRAV 13.2
6
21
TRAV 23
3
10
TRBV 7.3
2
8
TRBV 7.9
1
11
Segmentos variables fuertes
Segmentos variables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

FIG. 3

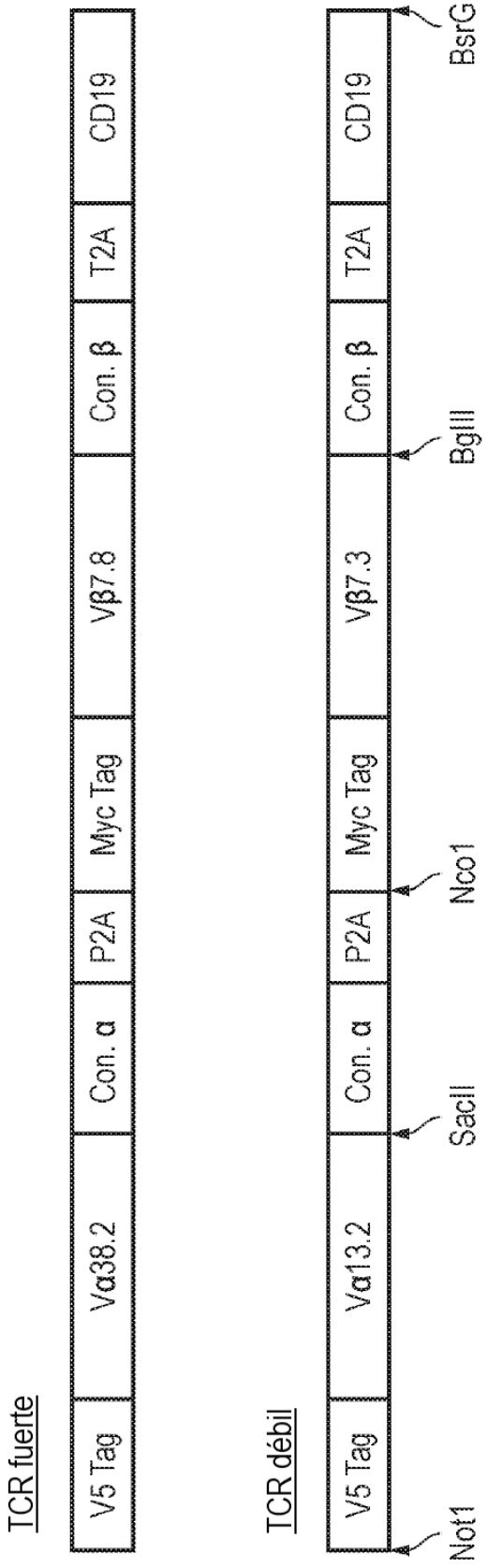
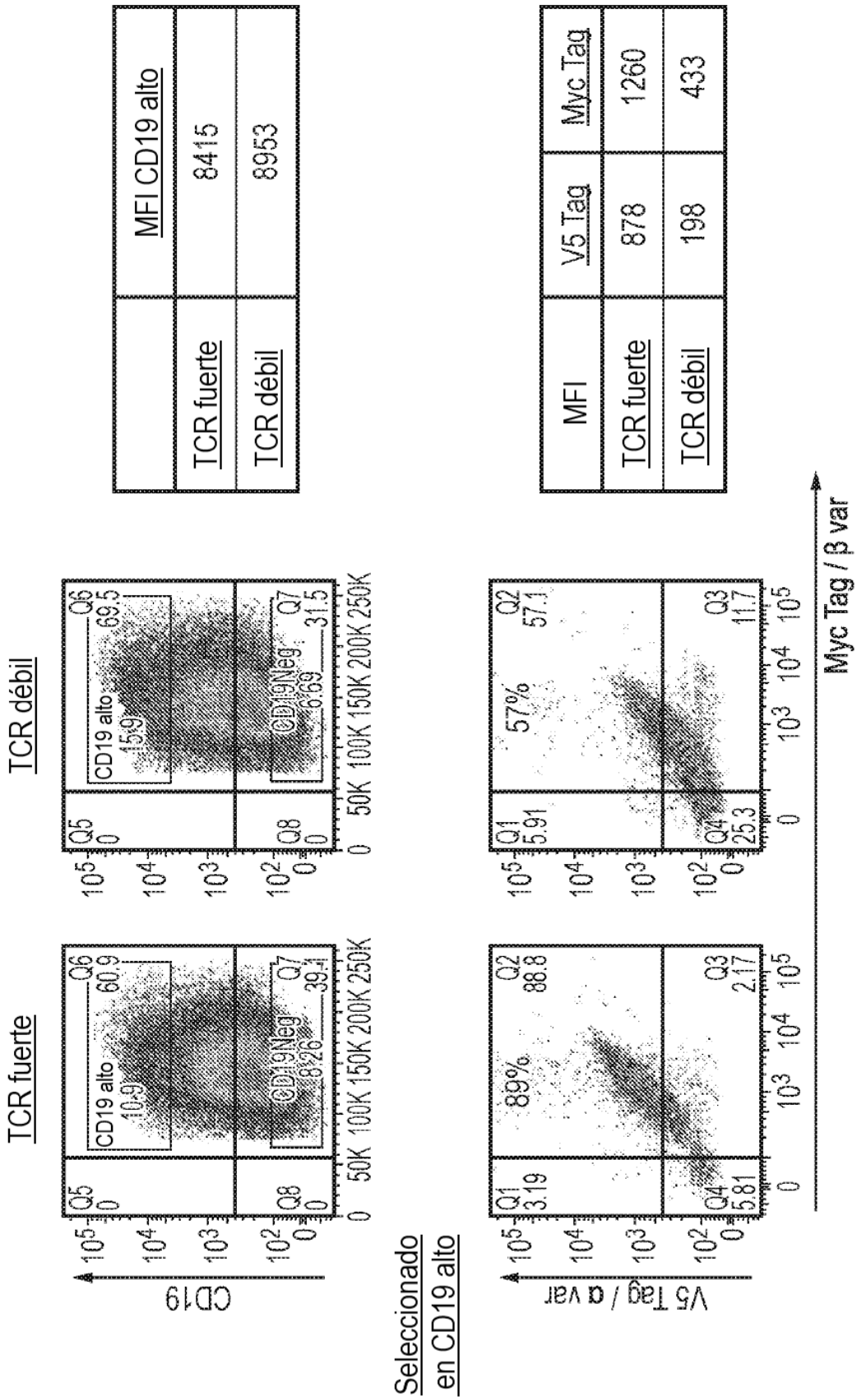

TCR fuerte
V5 Tag
Vα38.2
Con. α
P2A
Myc Tag
Vβ7.8
Con. β
T2A
CD19
TCR débil
V5 Tag
Vα13.2
Con. α
P2A
Myc Tag
Vβ7.3
Con. β
T2A
CD19
Not1
SacII
Nco1
BglII
BsrG1

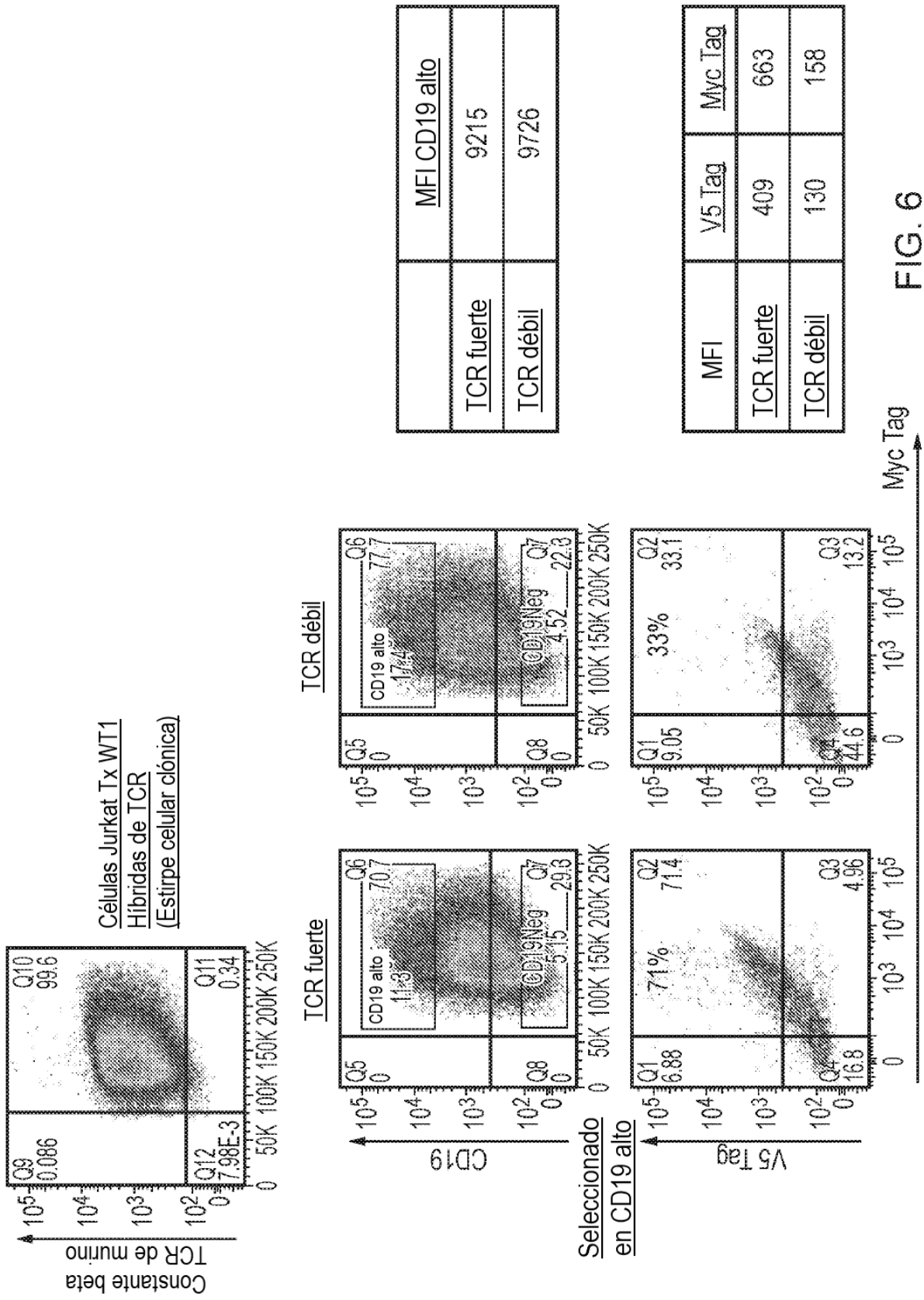
FIG. 4



	MFI CD19 alto
TCR fuerte	8415
TCR débil	8953

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

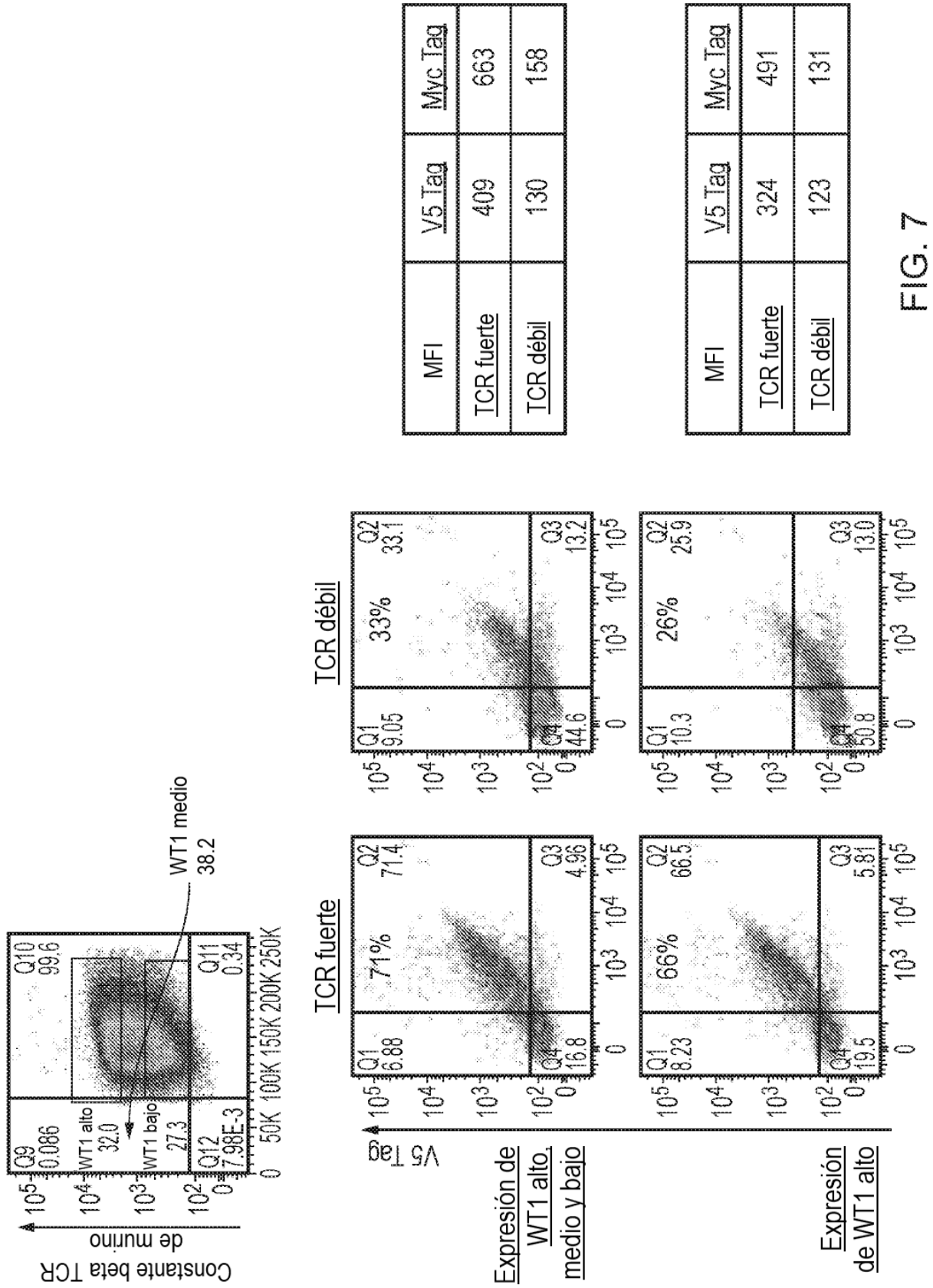
FIG. 5



	MFI CD19 alto
TCR fuerte	9215
TCR débil	9726

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

FIG. 6



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

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

FIG. 7

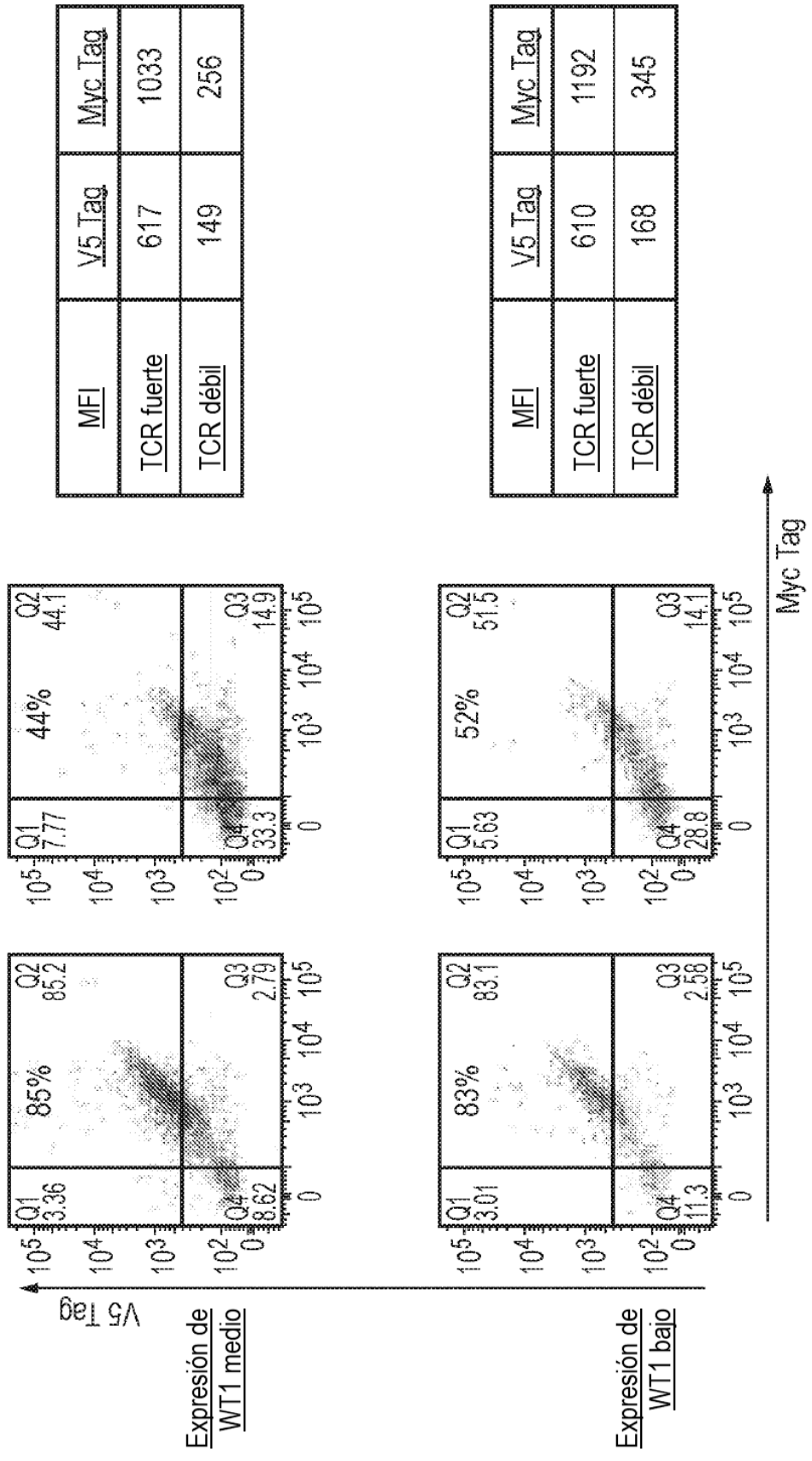


FIG. 7 (Continuación)

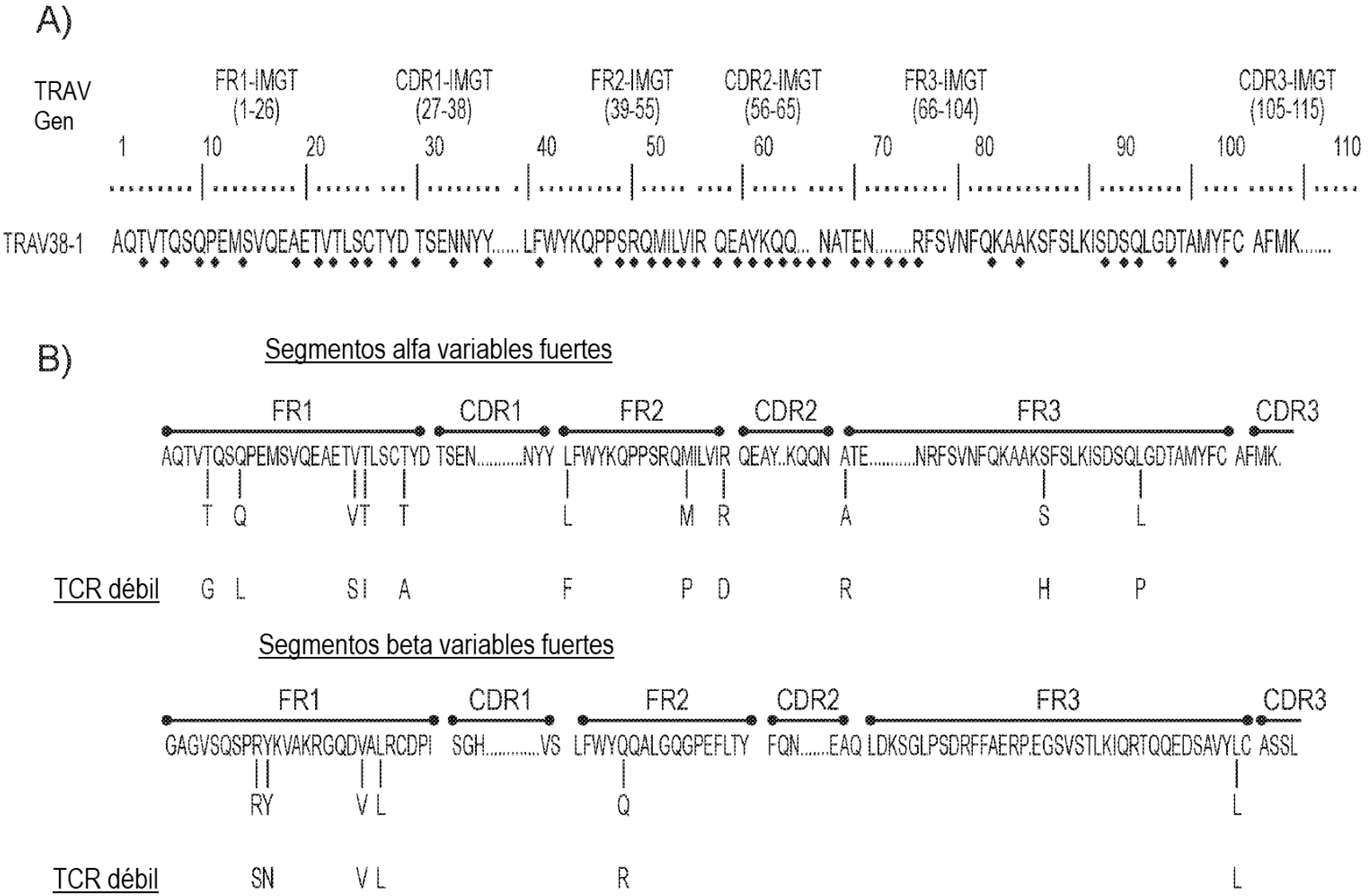
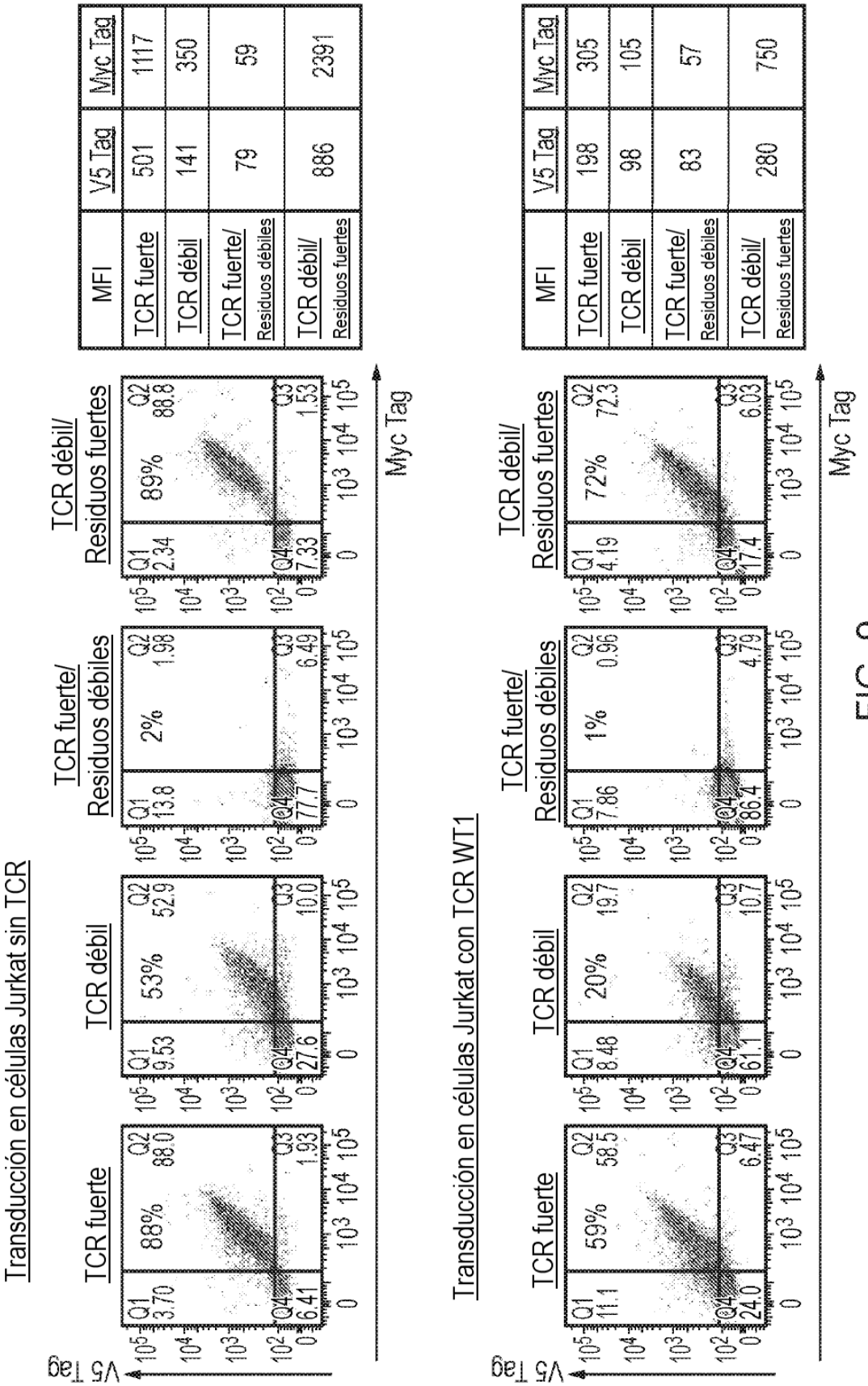

A)
TRAV Gen
FR1-IMGT (1-26)
CDR1-IMGT (27-38)
FR2-IMGT (39-55)
CDR2-IMGT (56-65)
FR3-IMGT (66-104)
CDR3-IMGT (105-115)
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
TRAV38-1 AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYD TSENNYY..... LFWYKQPPSRQMILVIR QEAYKQQ... NATEN.....RFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFC AFMK.....
B)
Segmentos alfa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

FIG. 8



MFI	V5 Tag	Myc Tag
TCR fuerte	501	1117
TCR débil	141	350
TCR fuerte/ Residuos débiles	79	59
TCR débil/ Residuos fuertes	886	2391

MFI	V5 Tag	Myc Tag
TCR fuerte	198	305
TCR débil	98	105
TCR fuerte/ Residuos débiles	83	57
TCR débil/ Residuos fuertes	280	750

FIG. 9

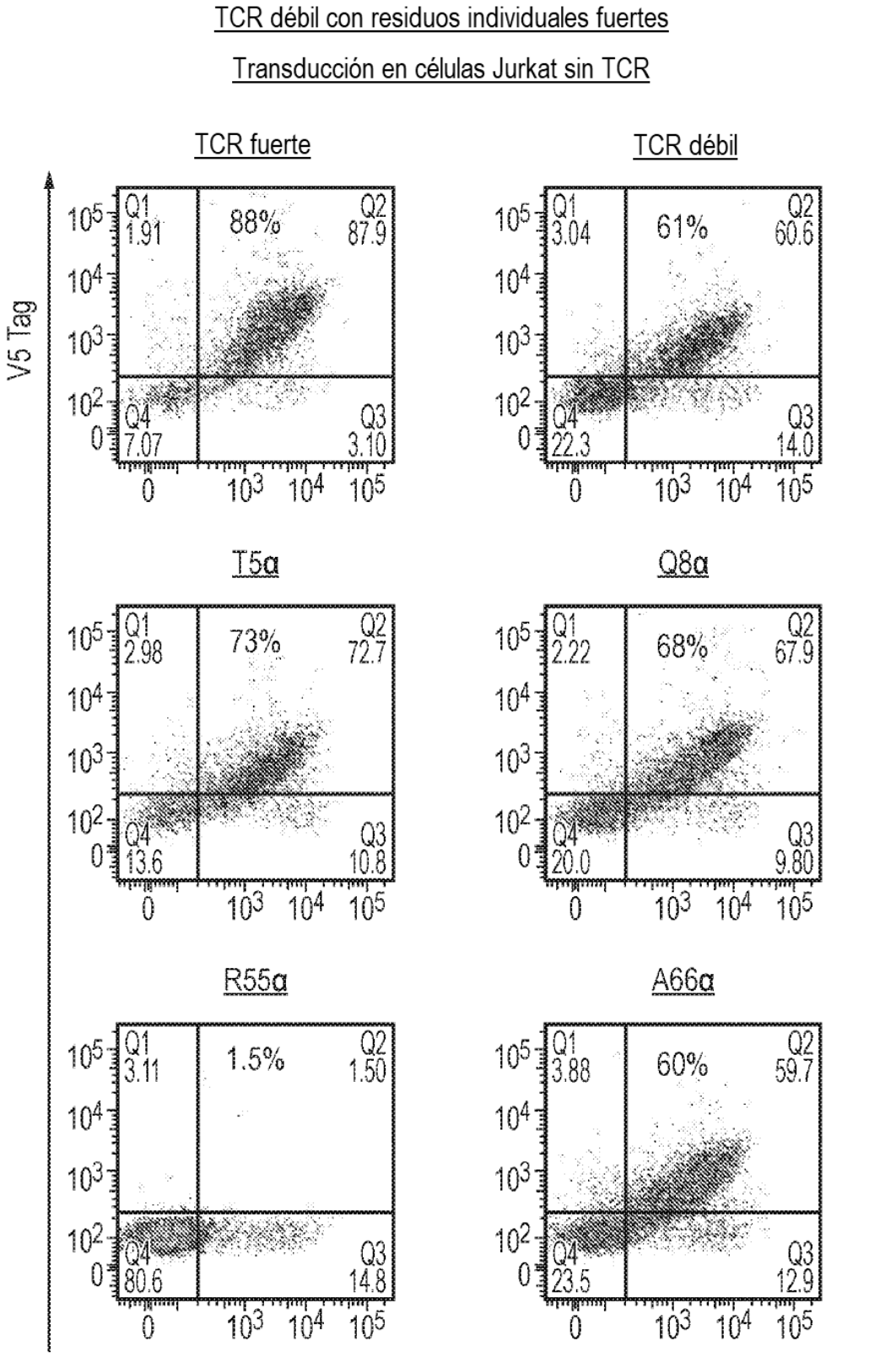

TCR débil con residuos individuales fuertes
Transducción en células Jurkat sin TCR
TCR fuerte
TCR débil
V5 Tag
Q1 1.91
88%
Q2 87.9
Q4 7.07
Q3 3.10
Q1 3.04
61%
Q2 60.6
Q4 22.3
Q3 14.0
T5α
Q8α
Q1 2.98
73%
Q2 72.7
Q4 13.6
Q3 10.8
Q1 2.22
68%
Q2 67.9
Q4 20.0
Q3 9.80
R55α
A66α
Q1 3.11
1.5%
Q2 1.50
Q4 80.6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

FIG. 10

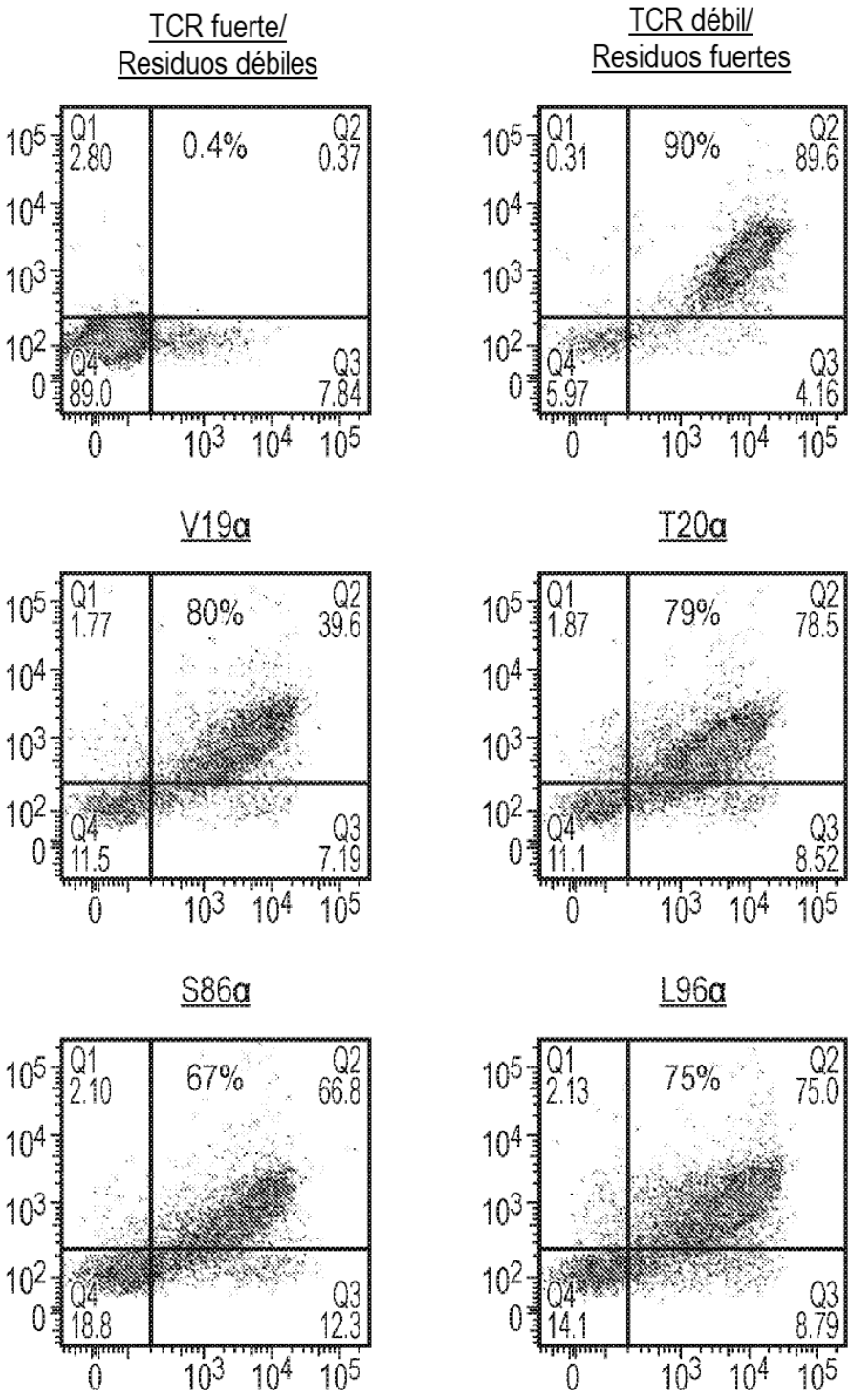


FIG. 10 (Continuación)

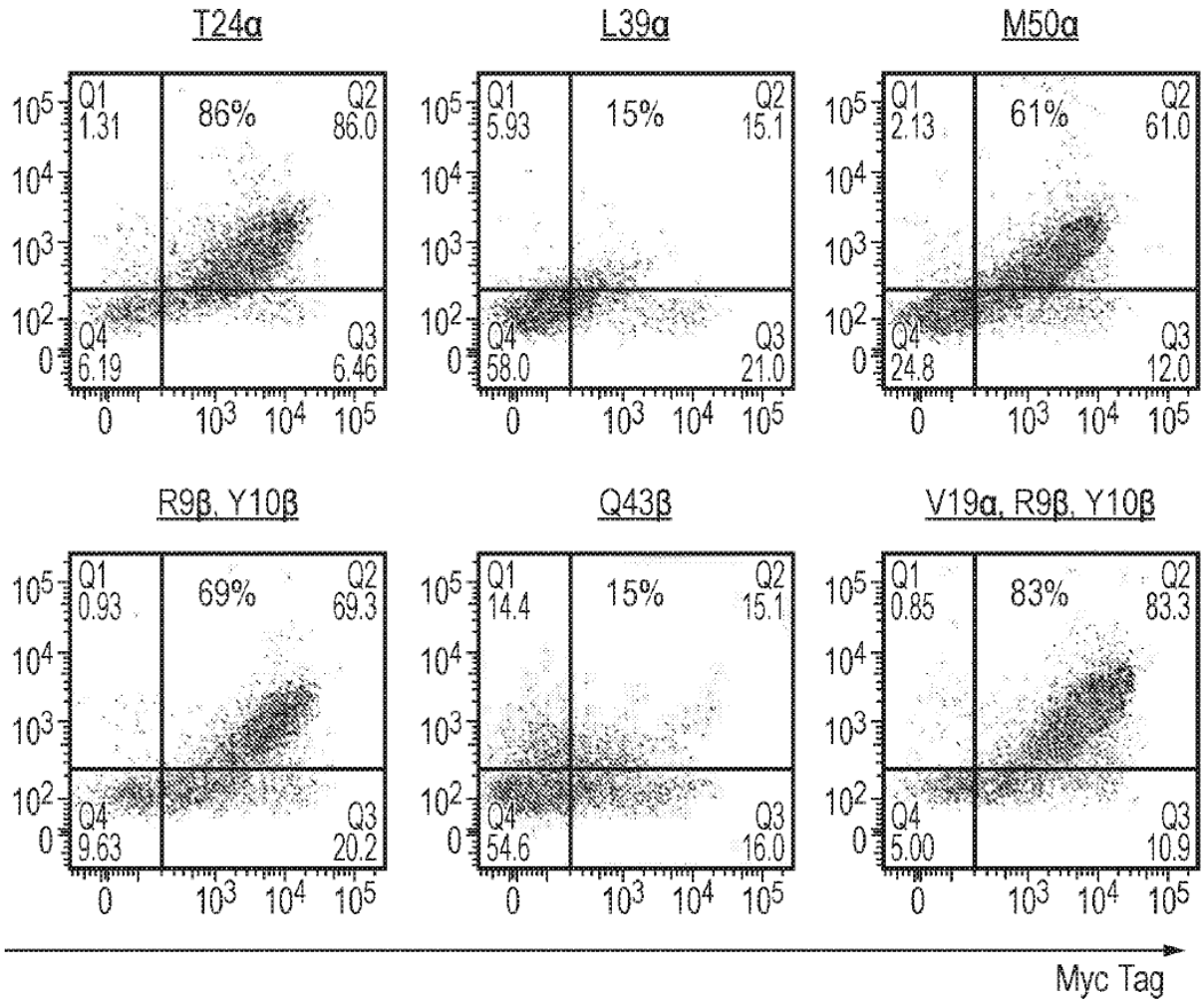


FIG. 10 (Continuación)

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

FIG. 10 (Continuación)

TCR débil con residuos individuales fuertes

Transducción en Células Jurkat WT1

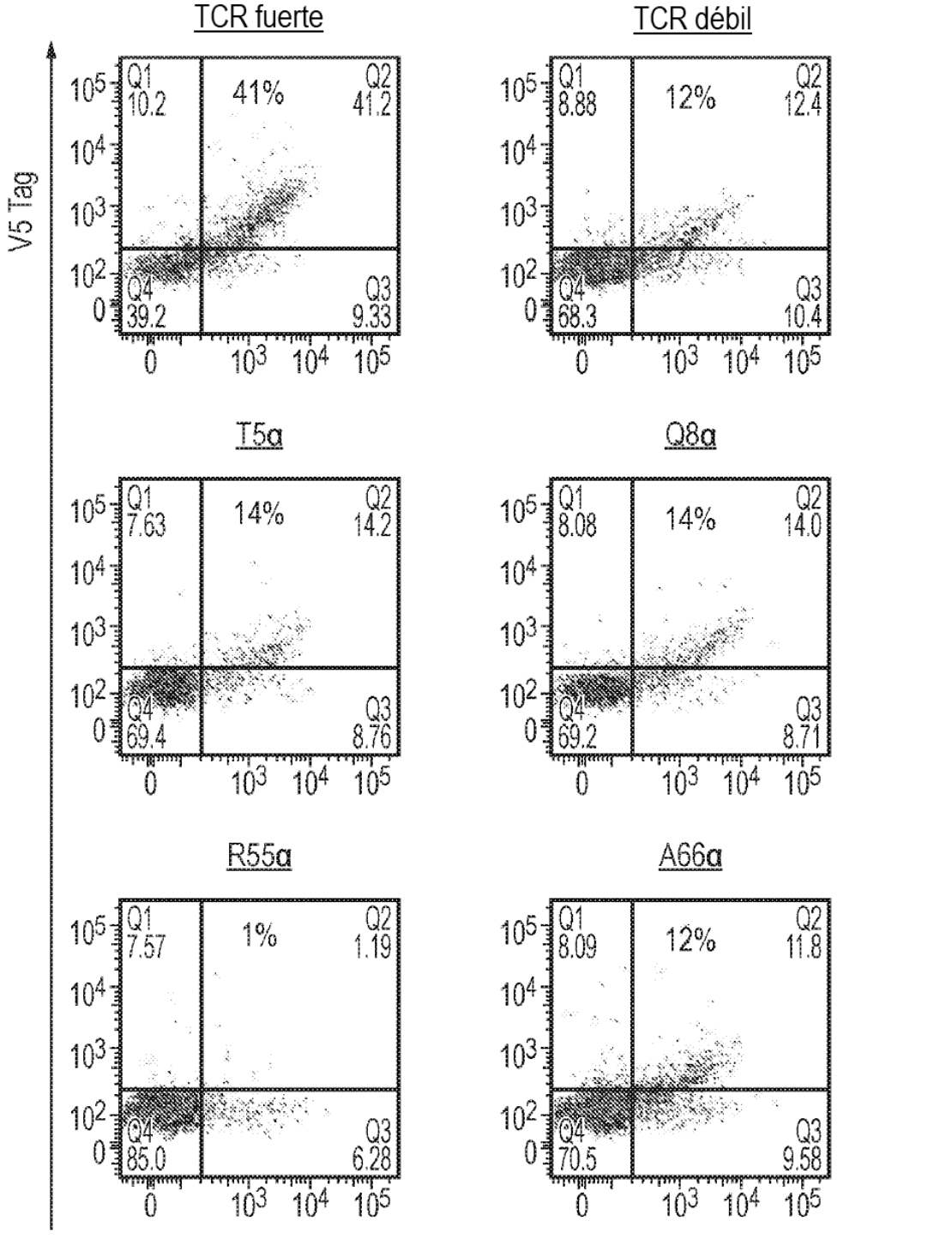


FIG. 11

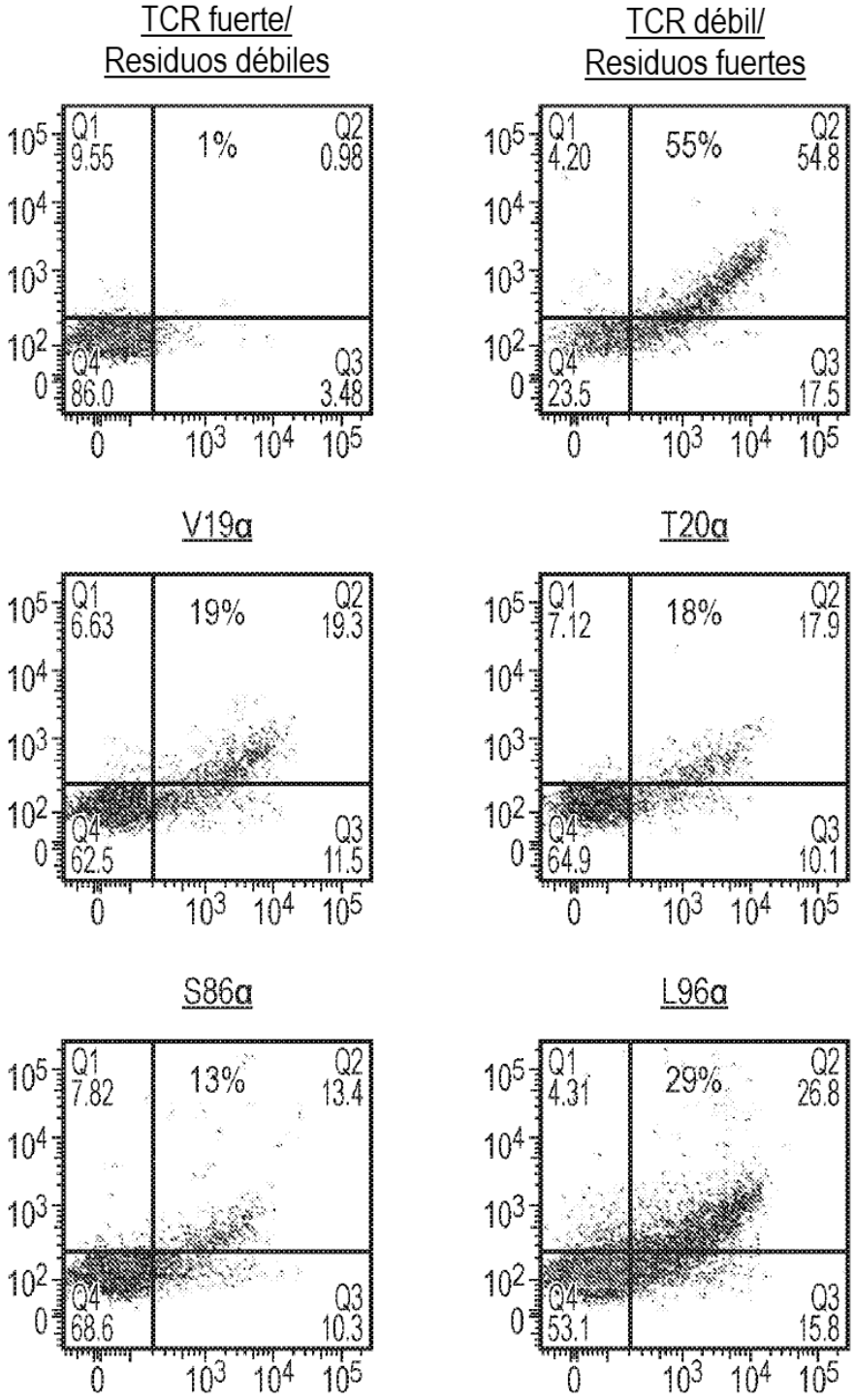


FIG. 11 (Continuación)

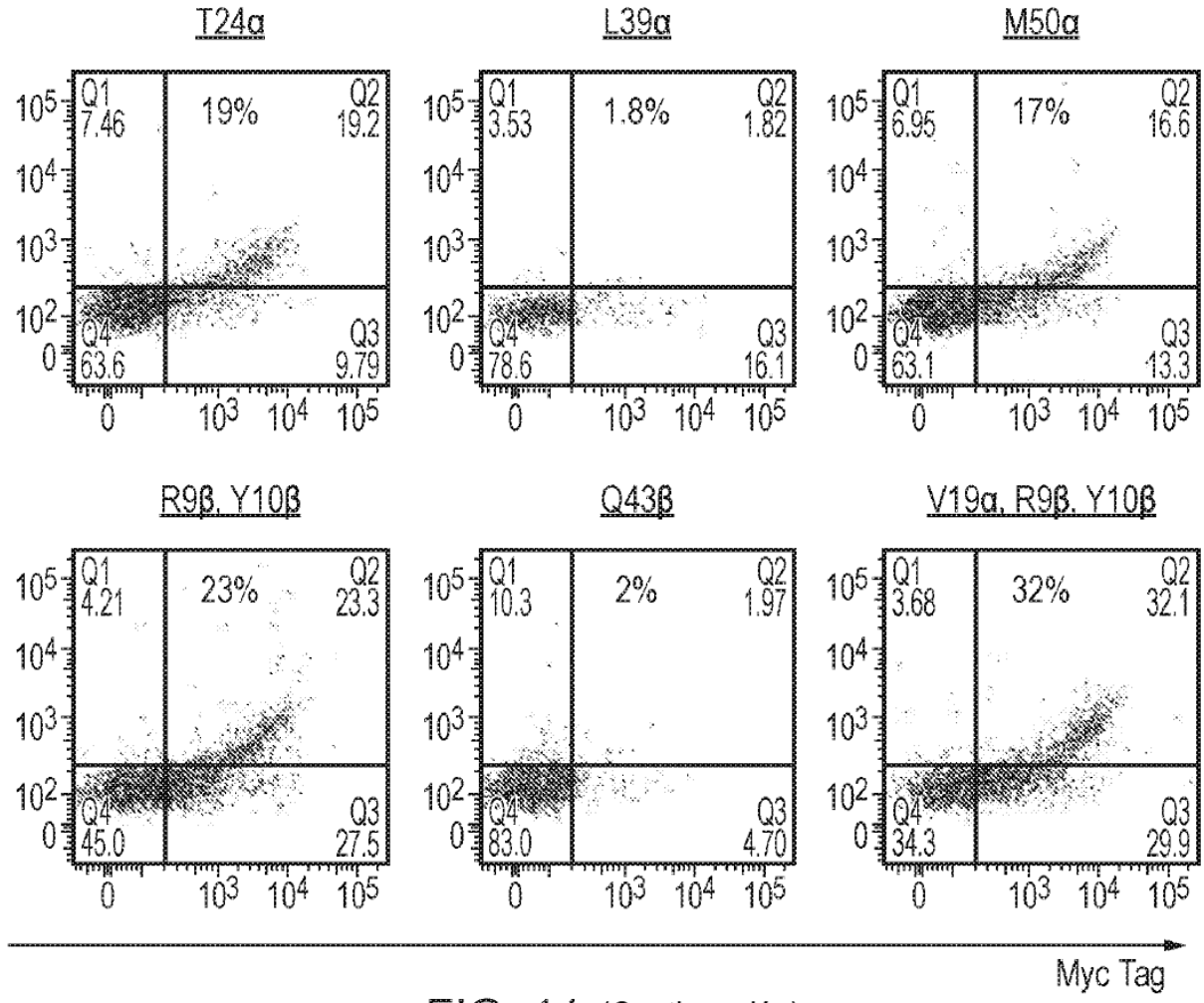


FIG. 11 (Continuación)

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

FIG. 11 (Continuación)

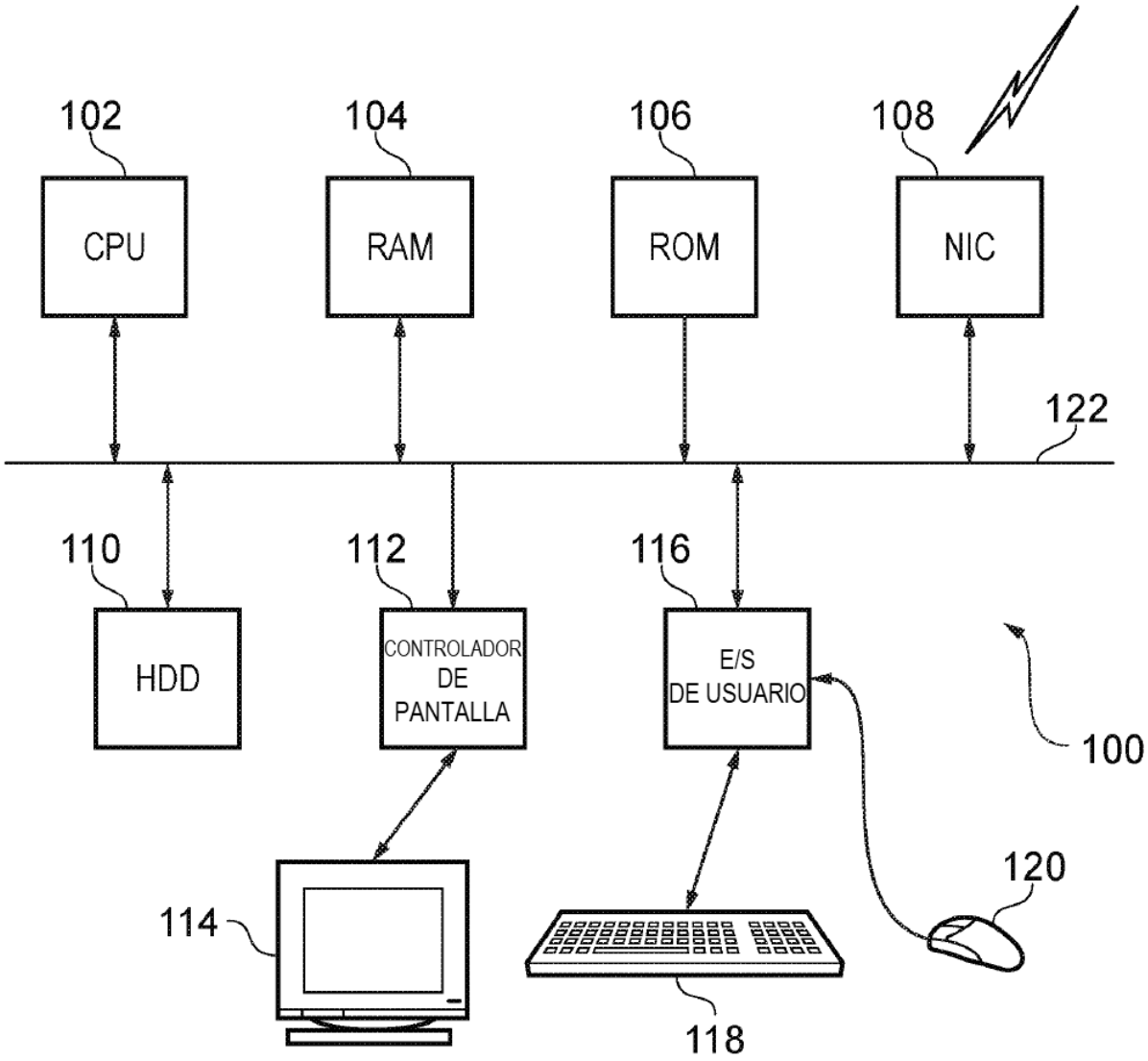
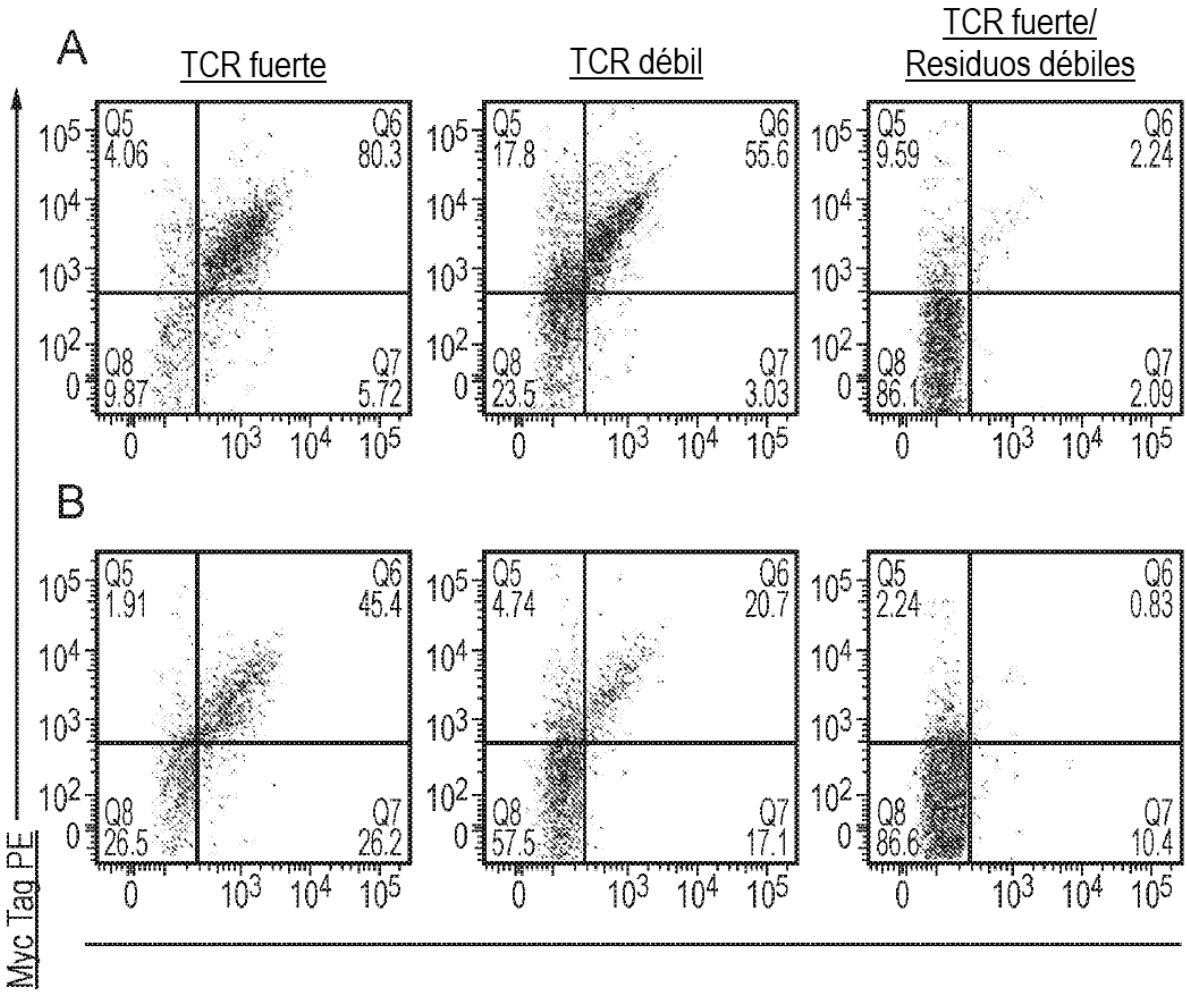
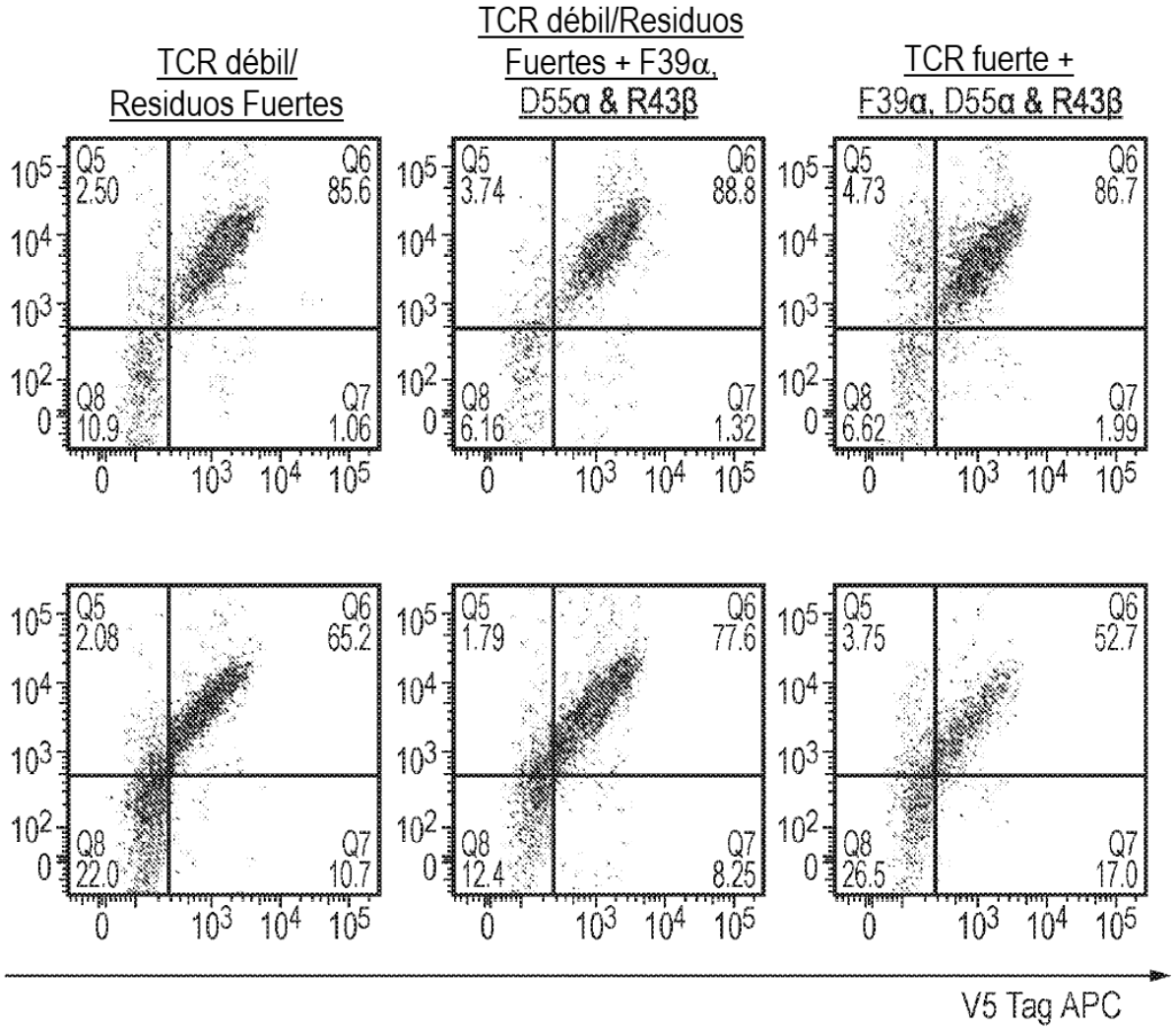

102
104
106
108
CPU
RAM
ROM
NIC
122
110
112
116
HDD
CONTROLADOR DE PANTALLA
E/S DE USUARIO
100
120
114
118

FIG. 12



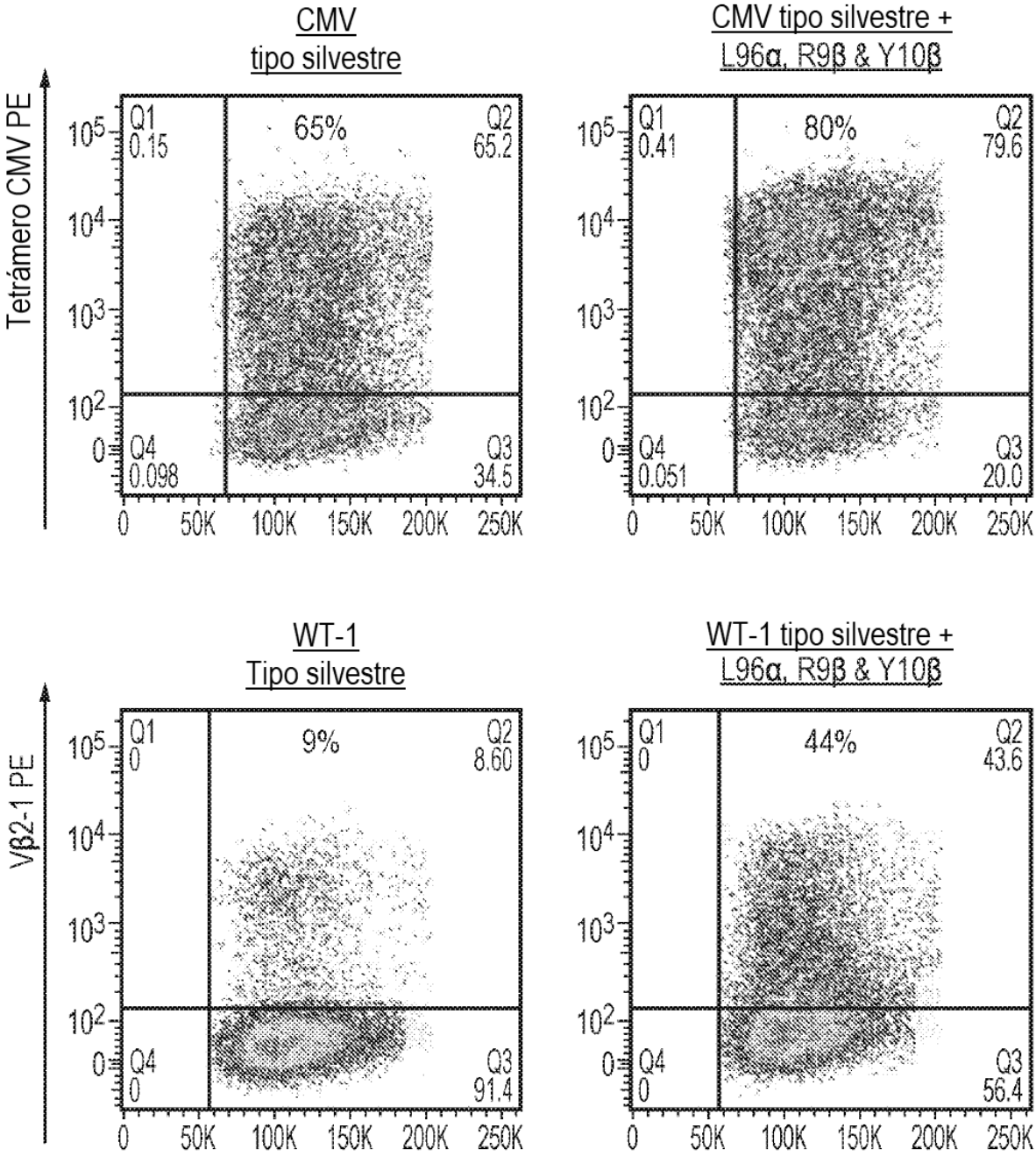
	MFI	TCR fuerte	TCR débil	TCR fuerte/ Residuos débiles
C	V5 Tag	864	328	149
	Myc Tag	2005	1392	114
D	V5 Tag	413	209	169
	Myc Tag	830	329	132
	Con beta	3866	3838	3747

FIG. 13



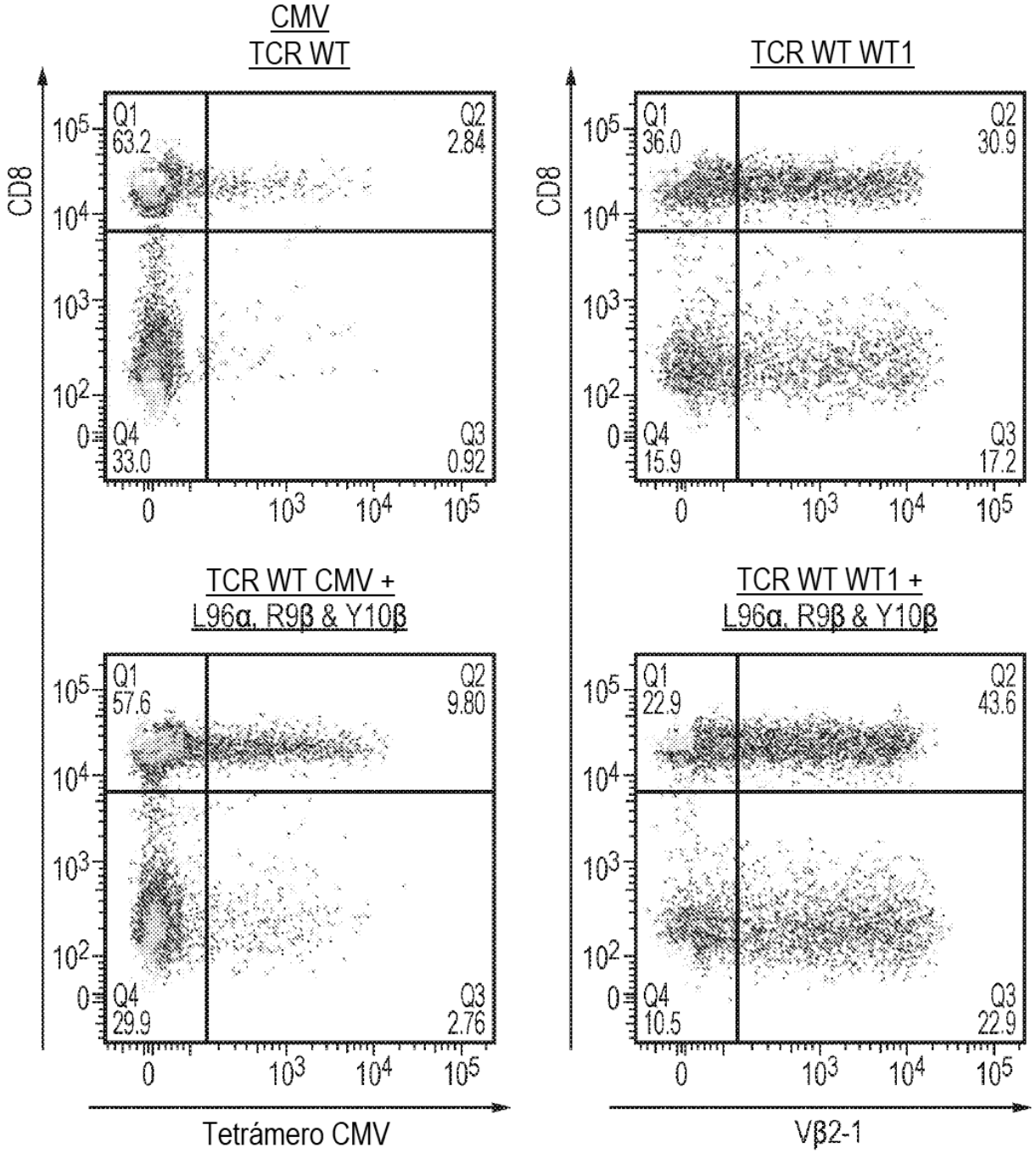
TCR débil / Residuos fuertes	TCR débil / Residuos fuertes -3aa	TCR fuerte -3aa
1338	1695	1295
5432	7020	4964
535	868	418
2143	3561	1295
3451	3045	3596

FIG. 13 (Continuación)



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

FIG. 14



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

FIG. 15

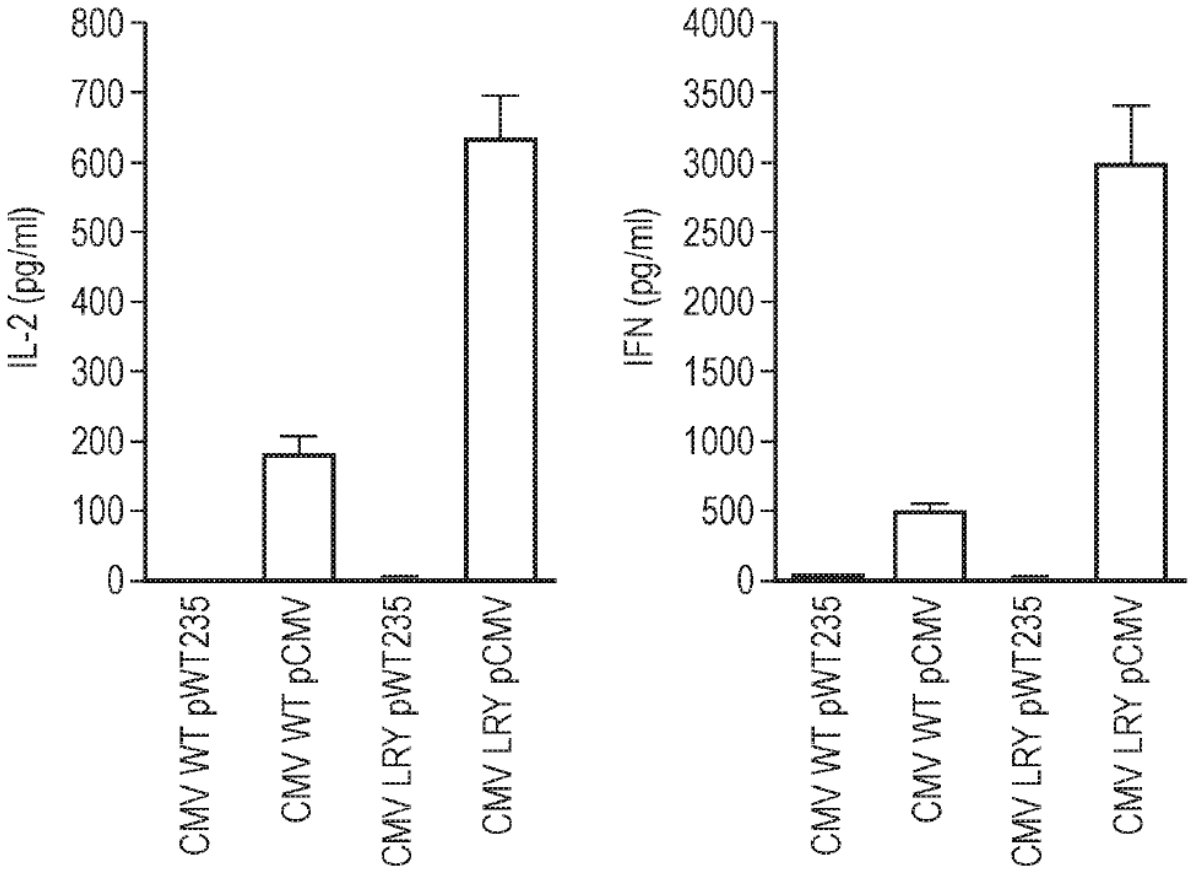

IL-2 (pg/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
CMV WT pWT235
CMV WT pCMV
CMV LRY pWT235
CMV LRY pCMV
IFN (pg/ml)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CMV WT pWT235
CMV WT pCMV
CMV LRY pWT235
CMV LRY pCMV

FIG. 16

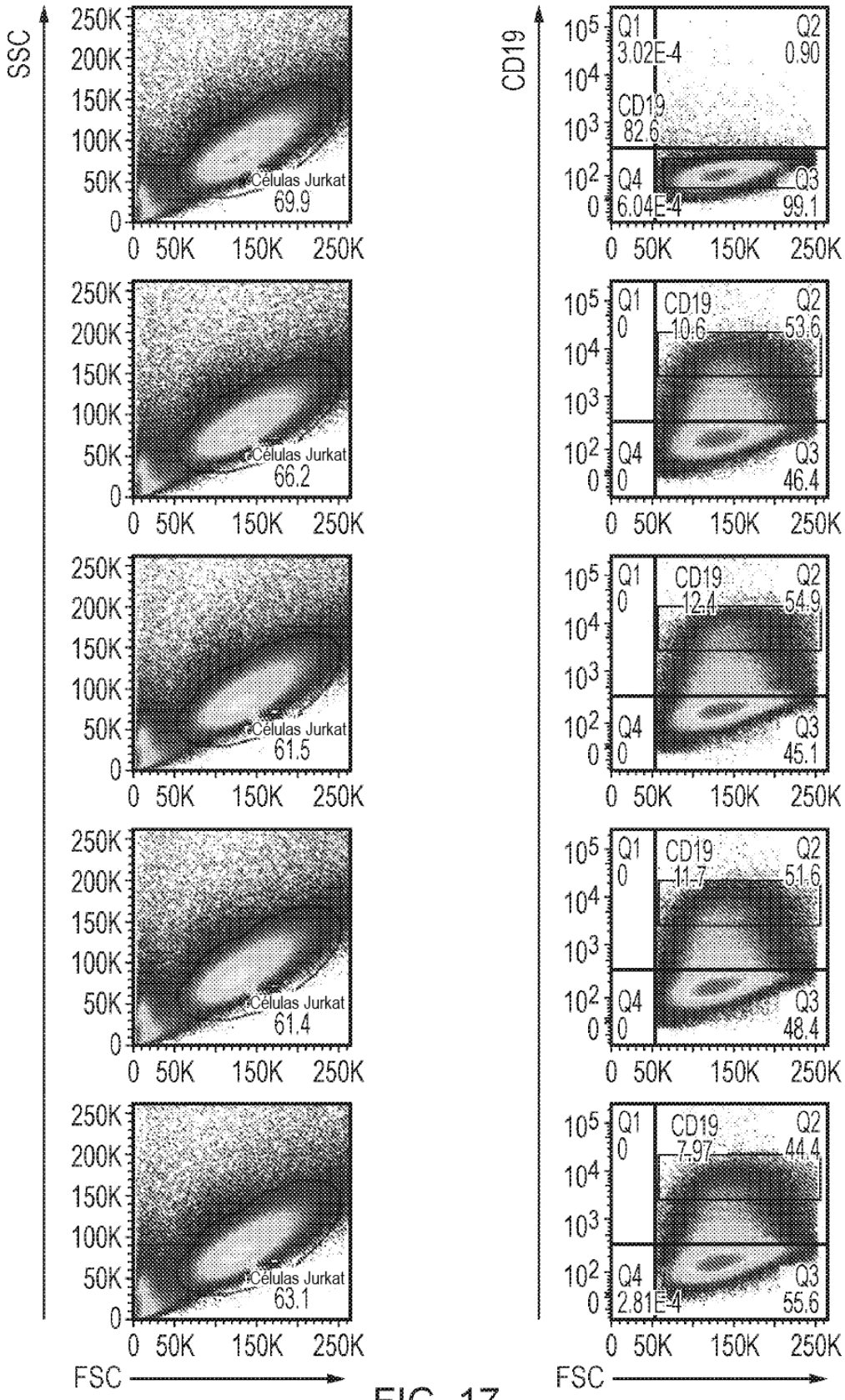

SSC
FSC
CD19
Células Jurkat
69.9
66.2
61.5
61.4
63.1
Q1
3.02E-4
Q2
0.90
CD19
82.6
Q4
6.04E-4
Q3
99.1
CD19
10.6
53.6
46.4
12.4
54.9
45.1
11.7
51.6
48.4
7.97
44.4
2.81E-4
55.6
0 50K 150K 250K
10^5
10^4
10^3
10^2
0

FIG. 17

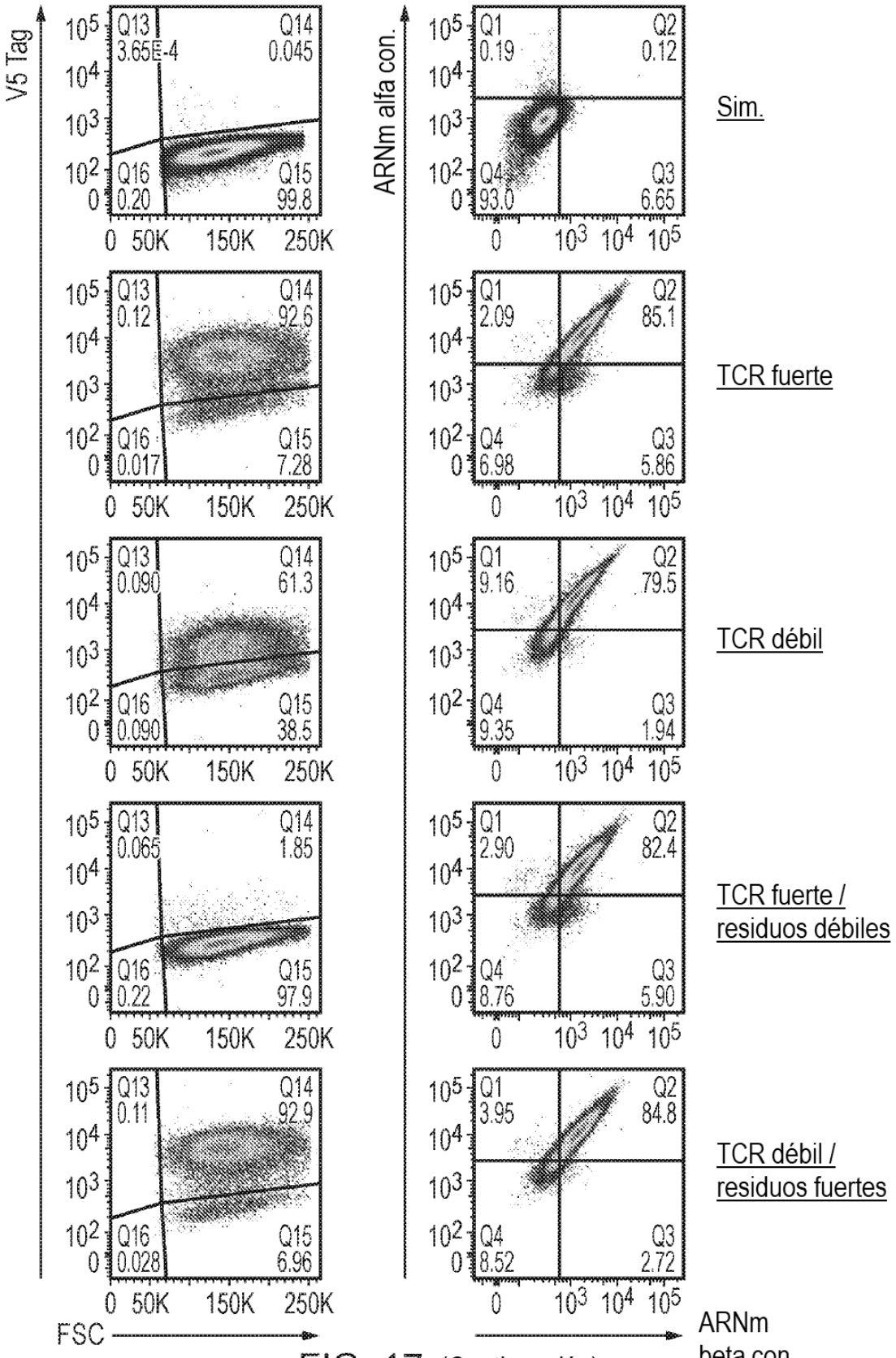


FIG. 17 (Continuación)

CD19 seleccionado

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

FIG. 17 (Continuación)

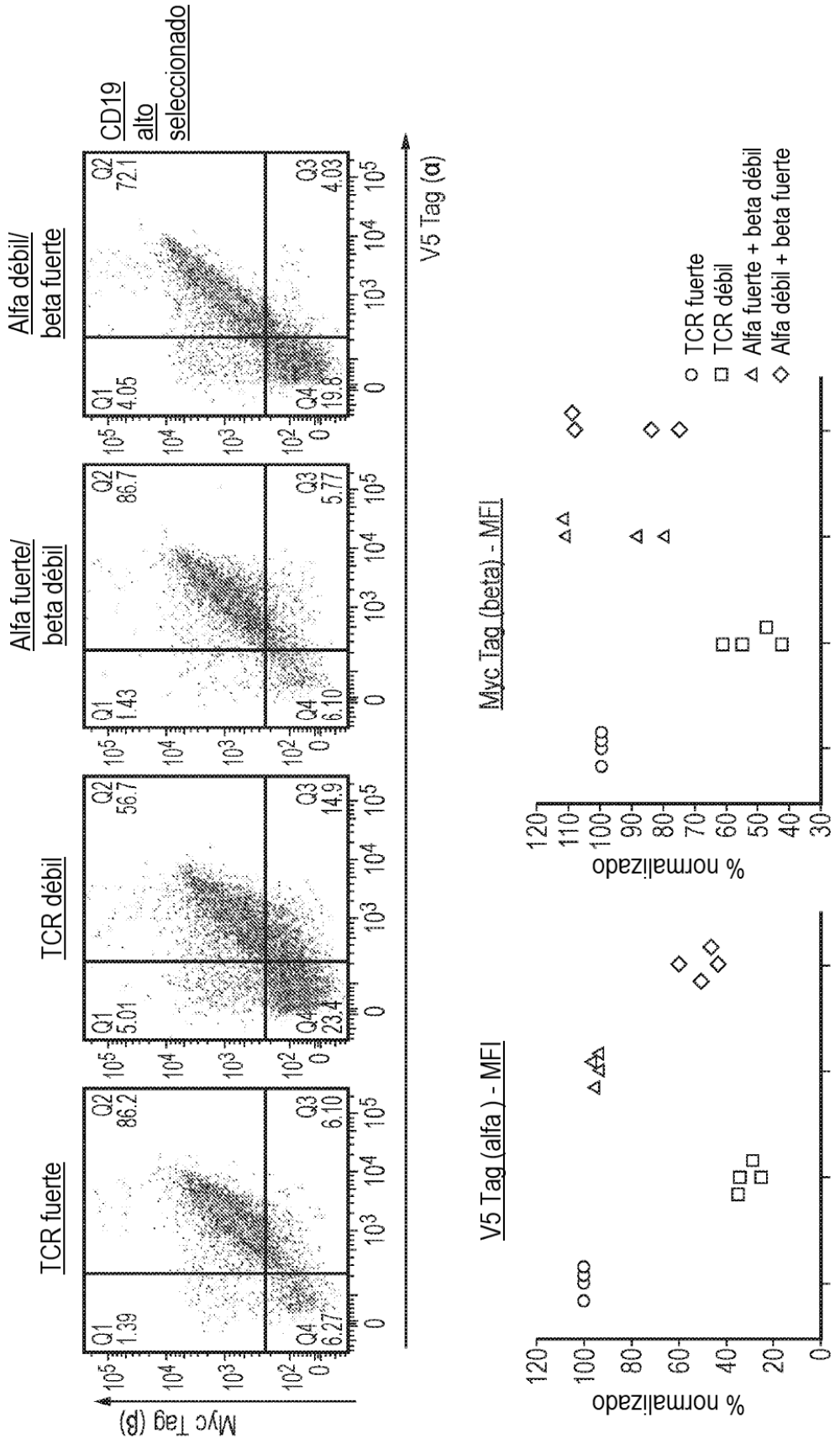

TCR fuerte
TCR débil
Alfa fuerte/ beta débil
Alfa débil/ beta fuerte
CD19 alto seleccionado
Myc Tag (β)
V5 Tag (α)
Q1 1.39
Q2 86.2
Q4 6.27
Q3 6.10
Q1 5.01
Q2 56.7
Q4 23.4
Q3 14.9
Q1 1.43
Q2 86.7
Q4 6.10
Q3 5.77
Q1 4.05
Q2 72.1
Q4 19.8
Q3 4.03
V5 Tag (alfa) - MFI
Myc Tag (beta) - MFI
% normalizado
TCR fuerte
TCR débil
Alfa fuerte + beta débil
Alfa débil + beta fuerte

FIG. 18

	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	4																			
Arg	-1	5																		
Asn	-2	0	6																	
Asp	-2	-2	1	6																
Cys	0	-3	-3	-3	9															
Gln	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

FIG. 19

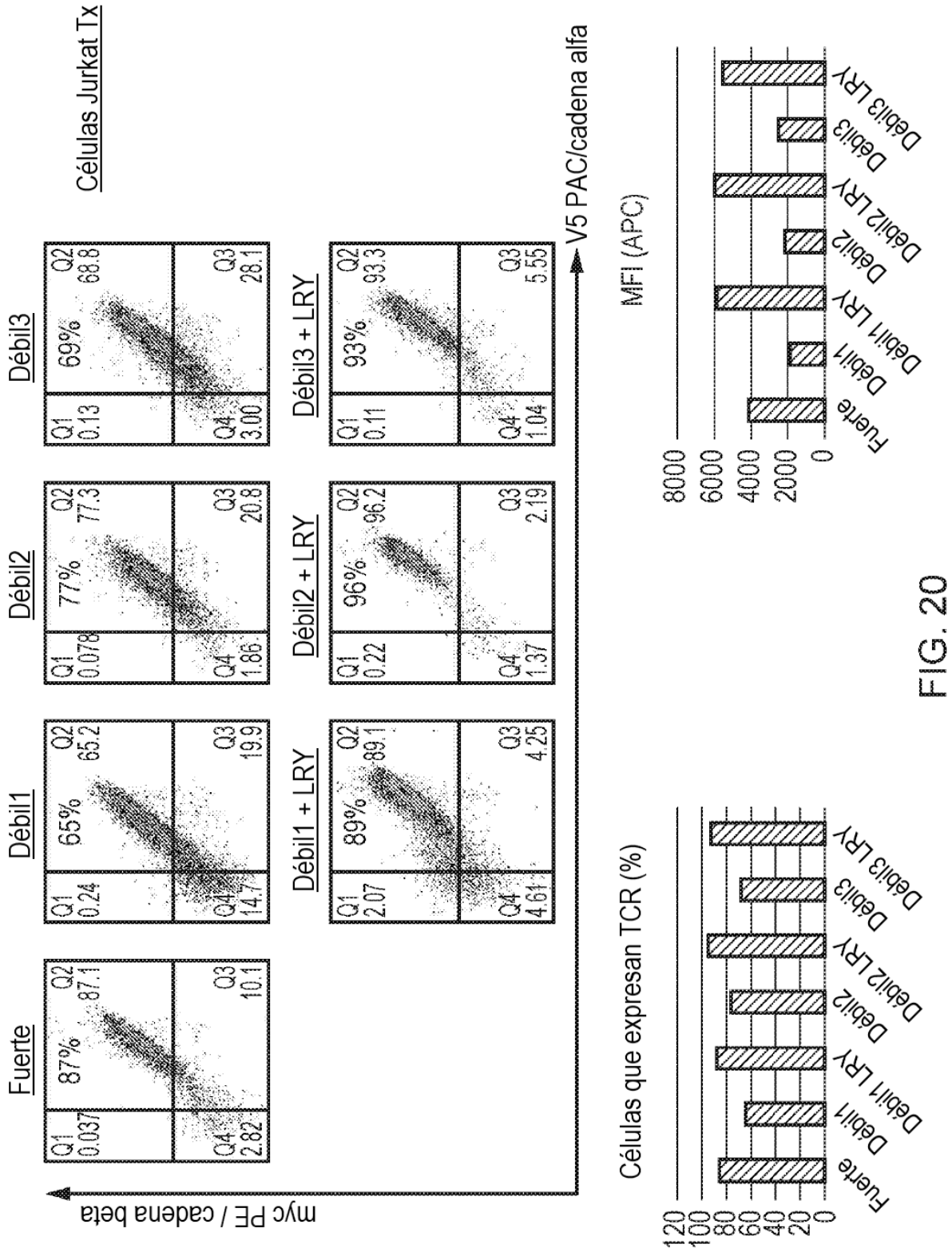
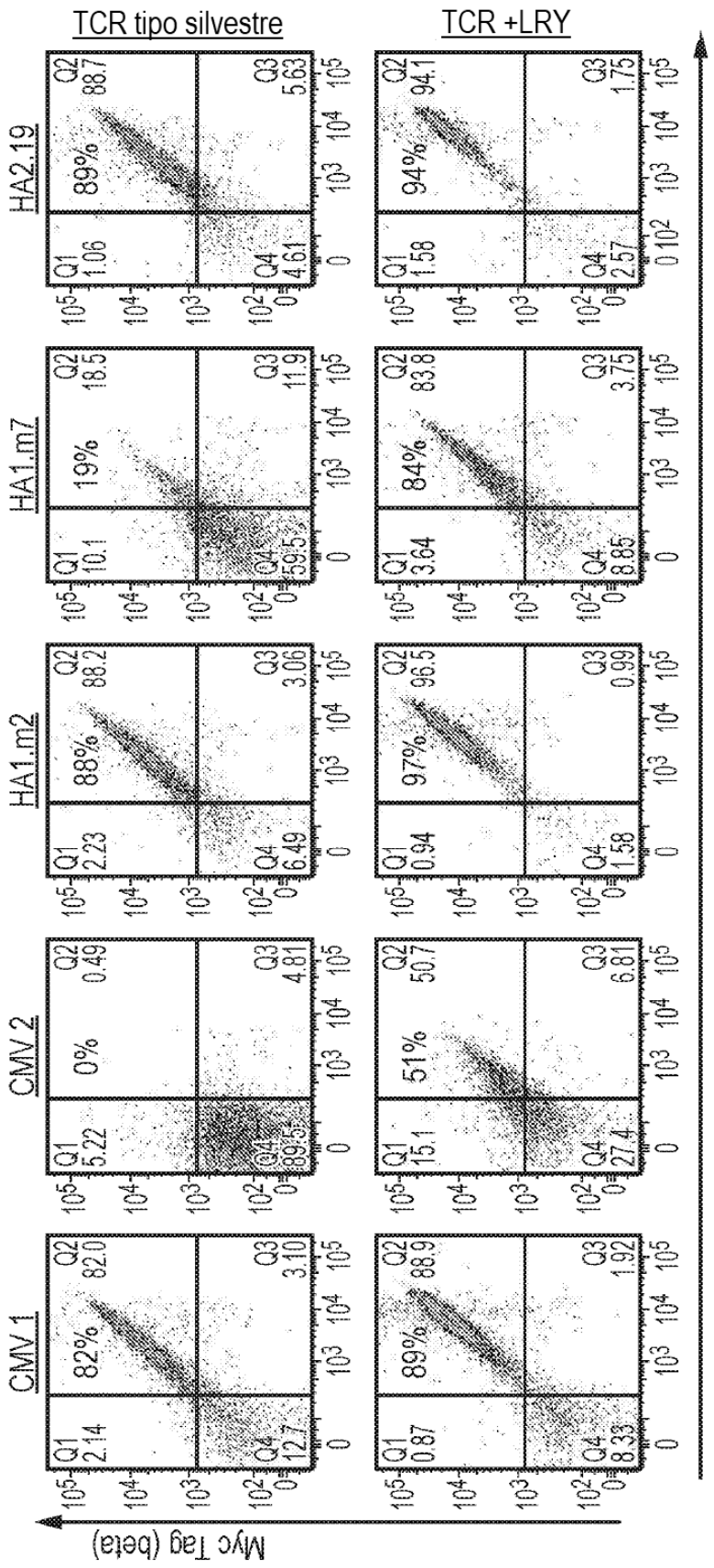
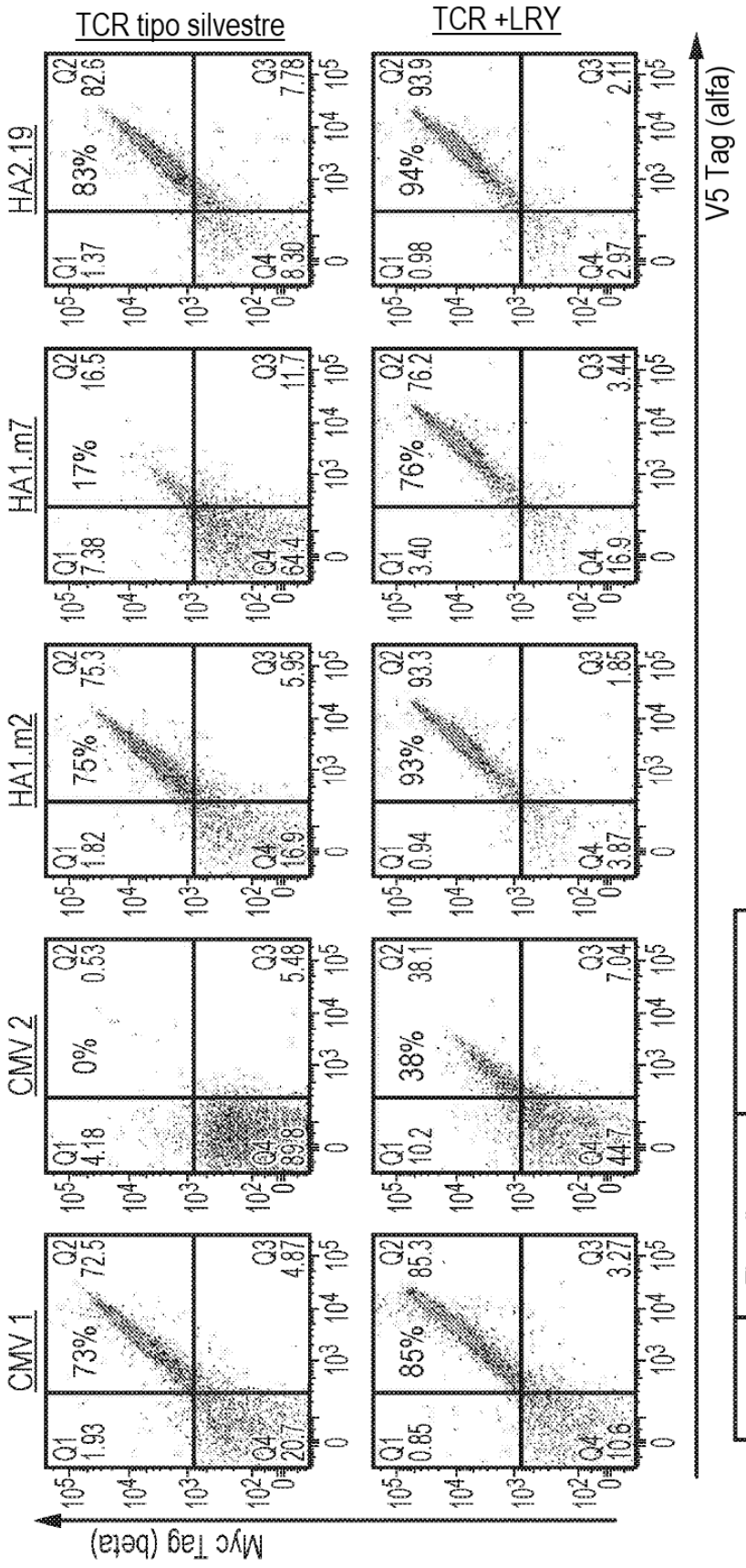

Células Jurkat Tx
Fuerte
Débil1
Débil2
Débil3
Débil1 + LRY
Débil2 + LRY
Débil3 + LRY
Q1 0.037
Q2 87.1
87%
Q3 10.1
Q4 2.82
Q1 0.24
Q2 65.2
65%
Q3 19.9
Q4 14.7
Q1 0.078
Q2 77.3
77%
Q3 20.8
Q4 1.86
Q1 0.13
Q2 68.8
69%
Q3 28.1
Q4 3.00
Q1 2.07
Q2 89.1
89%
Q3 4.25
Q4 4.61
Q1 0.22
Q2 96.2
96%
Q3 2.19
Q4 1.37
Q1 0.11
Q2 93.3
93%
Q3 5.55
Q4 1.04
myc PE / cadena beta
V5 PAC/cadena alfa
Células que expresan TCR (%)
120
100
80
60
40
20
0
Fuerte
Débil1
Débil1 LRY
Débil2
Débil2 LRY
Débil3
Débil3 LRY
MFI (APC)
8000
6000
4000
2000
0
Fuerte
Débil1
Débil1 LRY
Débil2
Débil2 LRY
Débil3
Débil3 LRY

FIG. 20



MFI	Tipo silvestre		+LRY	
	Alfa	Beta	Alfa	Beta
CMV1	2143	5353	6107	13067
CMV2	67	197	333	1170
HA1.m2	1756	4740	5340	13295
HA1.m7	158	408	1314	3811
HA2.19	2520	3765	7953	15039

FIG. 21



MFI	Tipo silvestre		+ LRY	
	Alfa	Beta	Alfa	Beta
CMV1	2132	4626	5445	12317
CMV2	72	154	252	738
HA1.m2	1351	2874	4375	9467
HA1.m7	165	355	1162	3329
HA2.19	2574	2944	8032	11683

FIG. 22

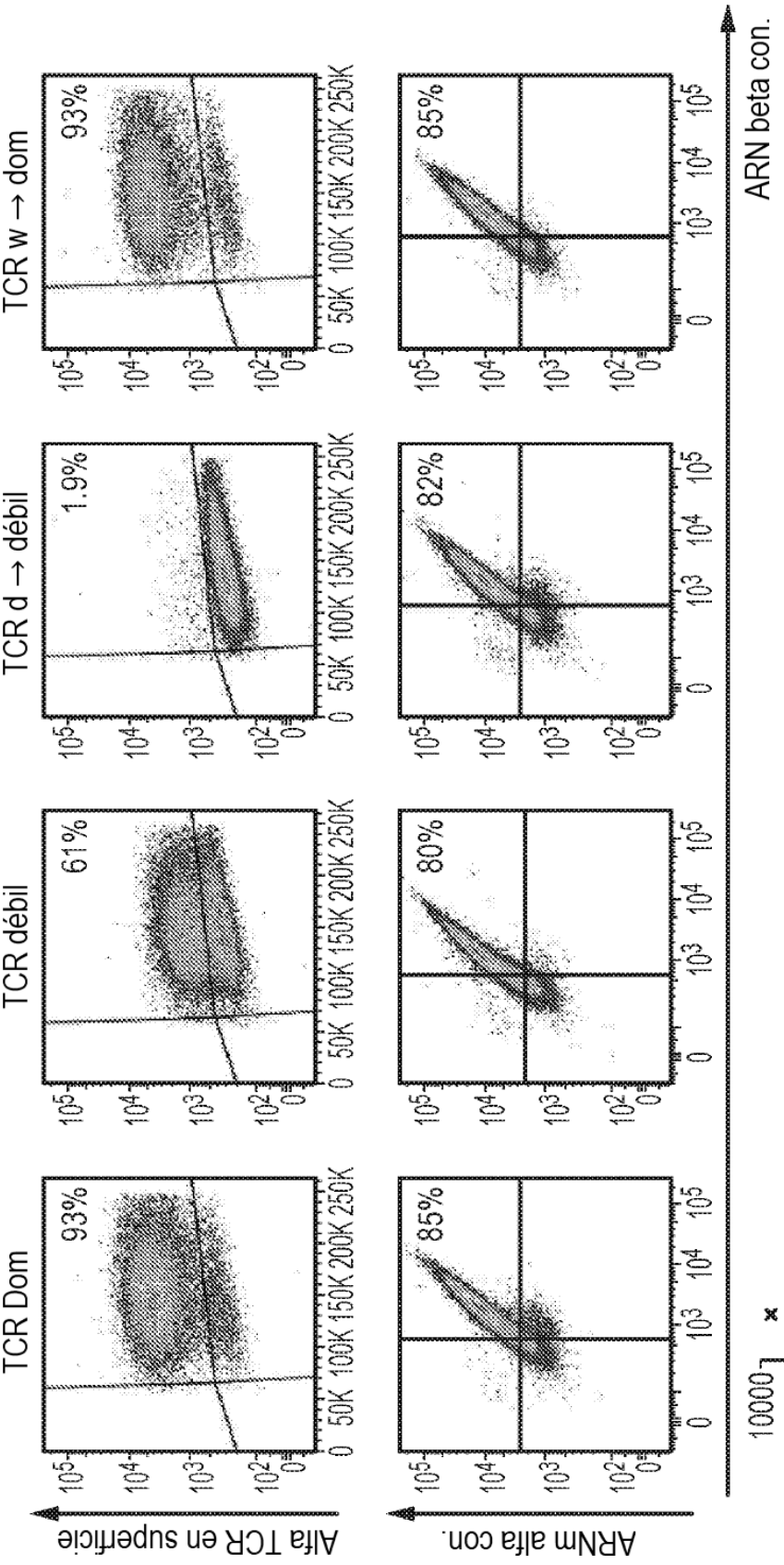

TCR Dom
TCR débil
TCR d → débil
TCR w → dom
93%
61%
1.9%
93%
85%
80%
82%
85%
Alfa TCR en superficie
ARNm alfa con.
ARN beta con.
0 50K 100K 150K 200K 250K
MFI
10000
9000
8000
2000
1000
0
Dom
Débil
Conv d
Conv w
TCR → débil → dom
× Cadena alfa
o Cadena beta

FIG. 23a

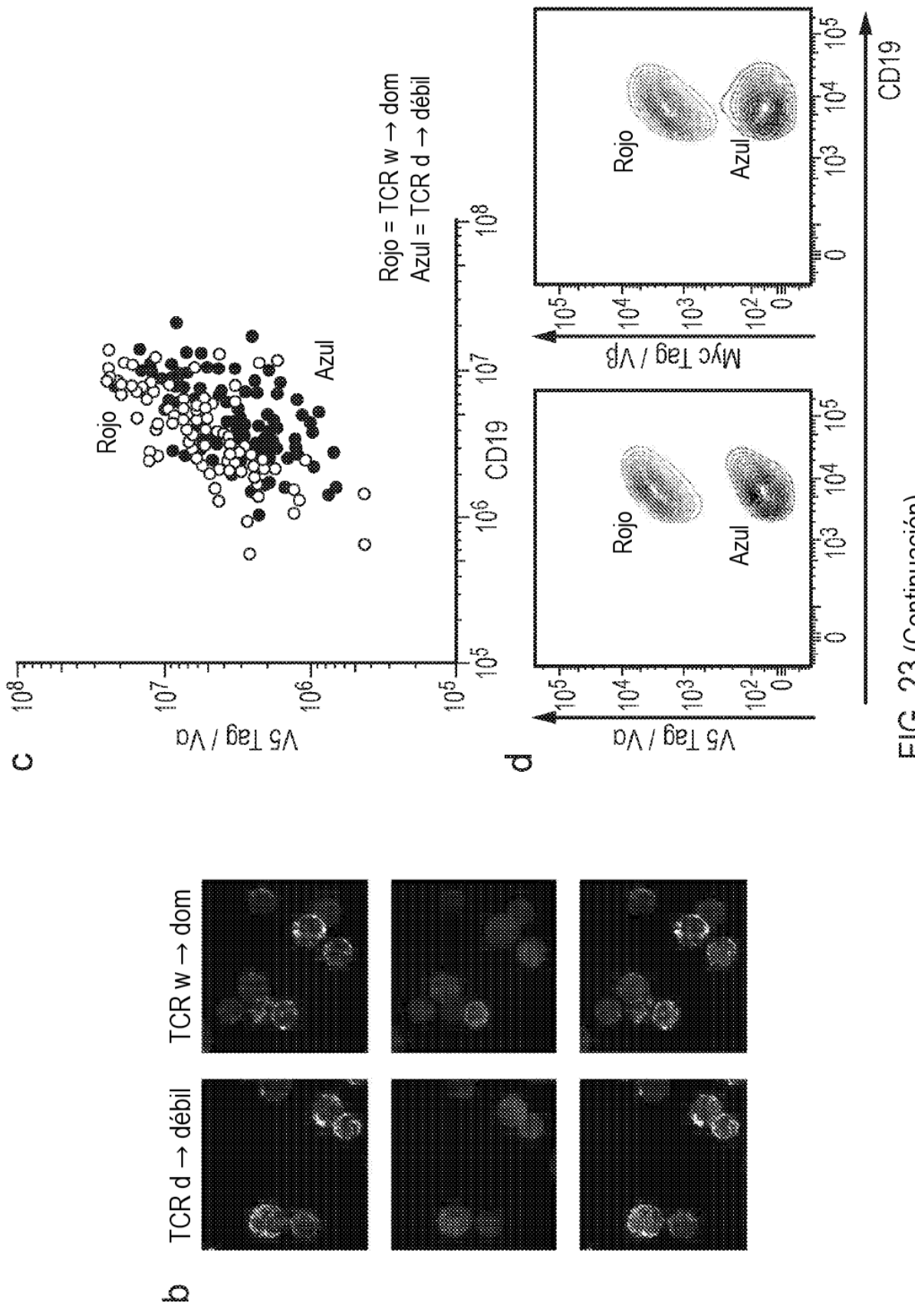
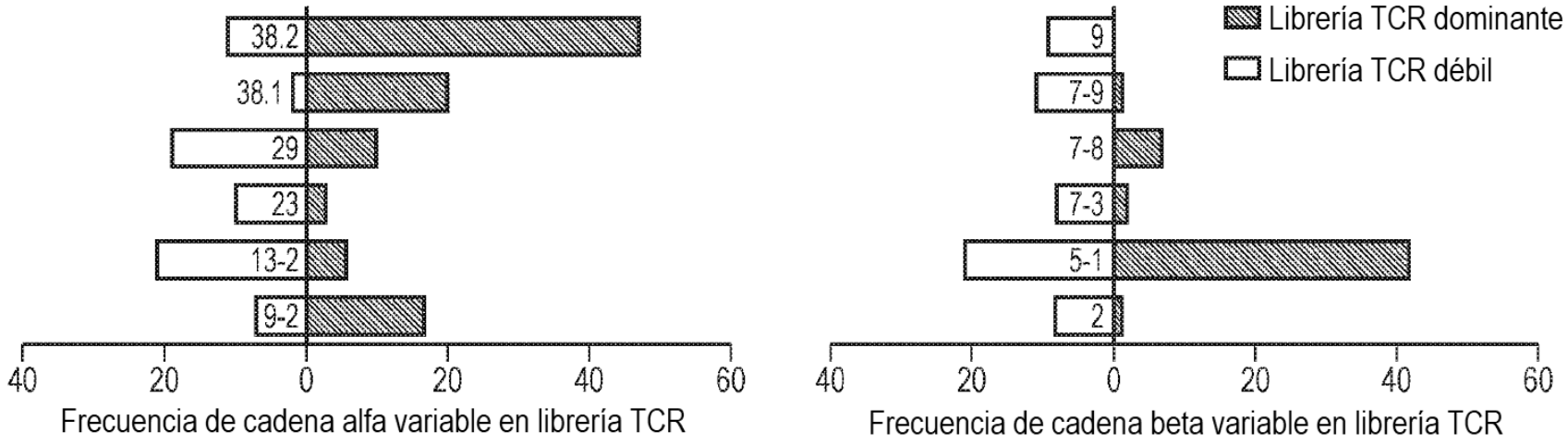
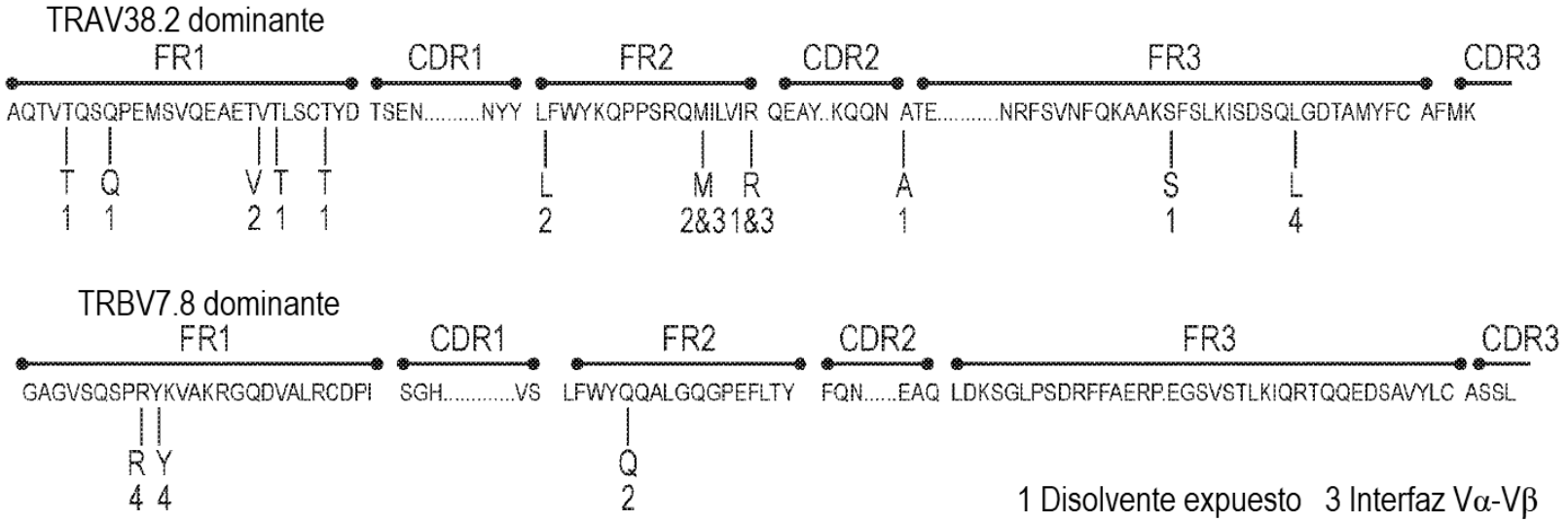


FIG. 23 (Continuación)





1 Disolvente expuesto
2 Hidrófobo
3 Interfaz Vα-Vβ
4 Interfaz V-C

FIG. 24

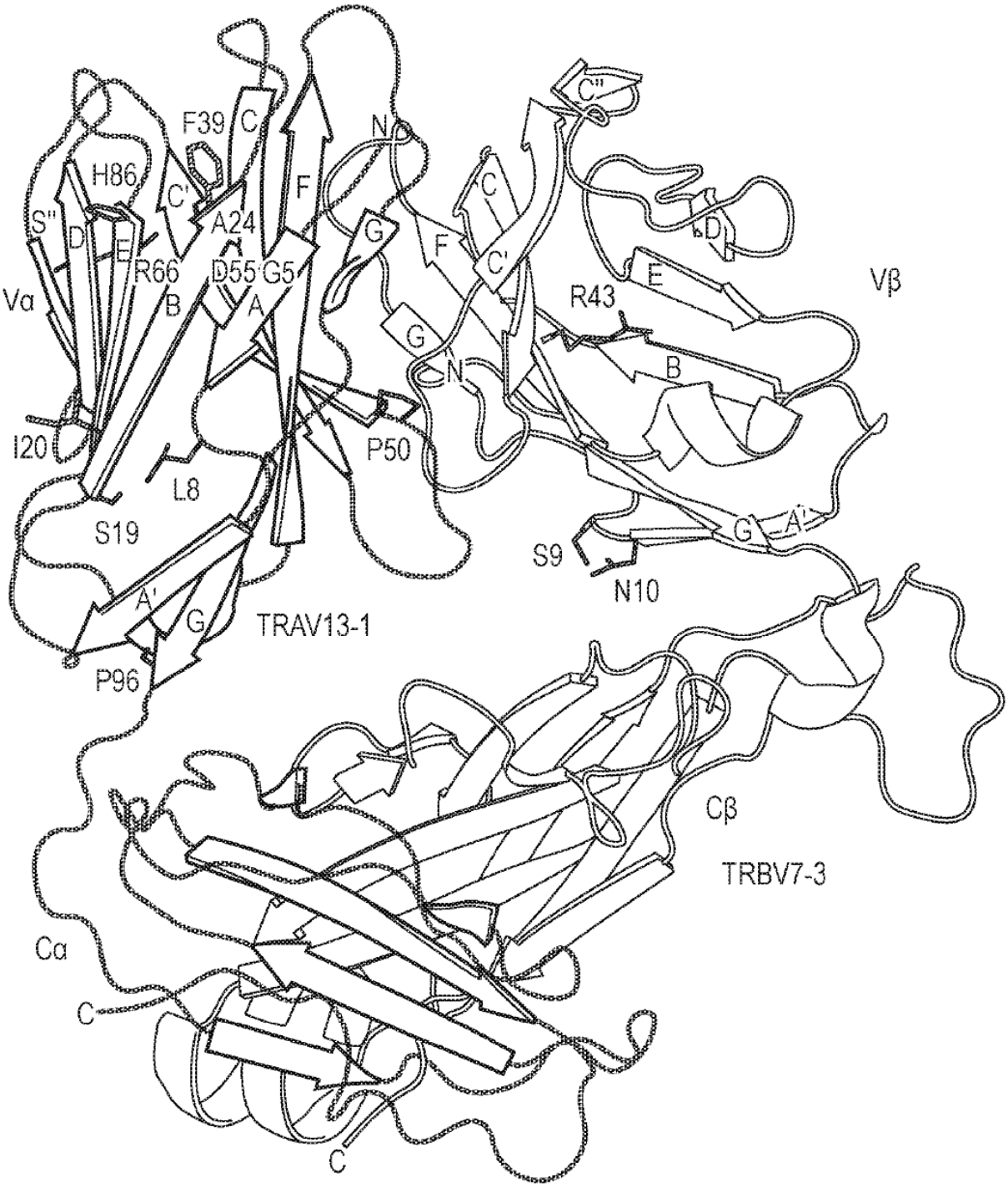

F39
C
N
C"
H86
C'
F
C
S"
D
E
A24
G
F
D
R66
D55
G5
C'
E
Vβ
Vα
B
A
R43
G
N
B
I20
P50
L8
S19
G
A'
S9
N10
A'
G
TRAV13-1
P96
Cβ
TRBV7-3
Cα
C
C

FIG. 25a

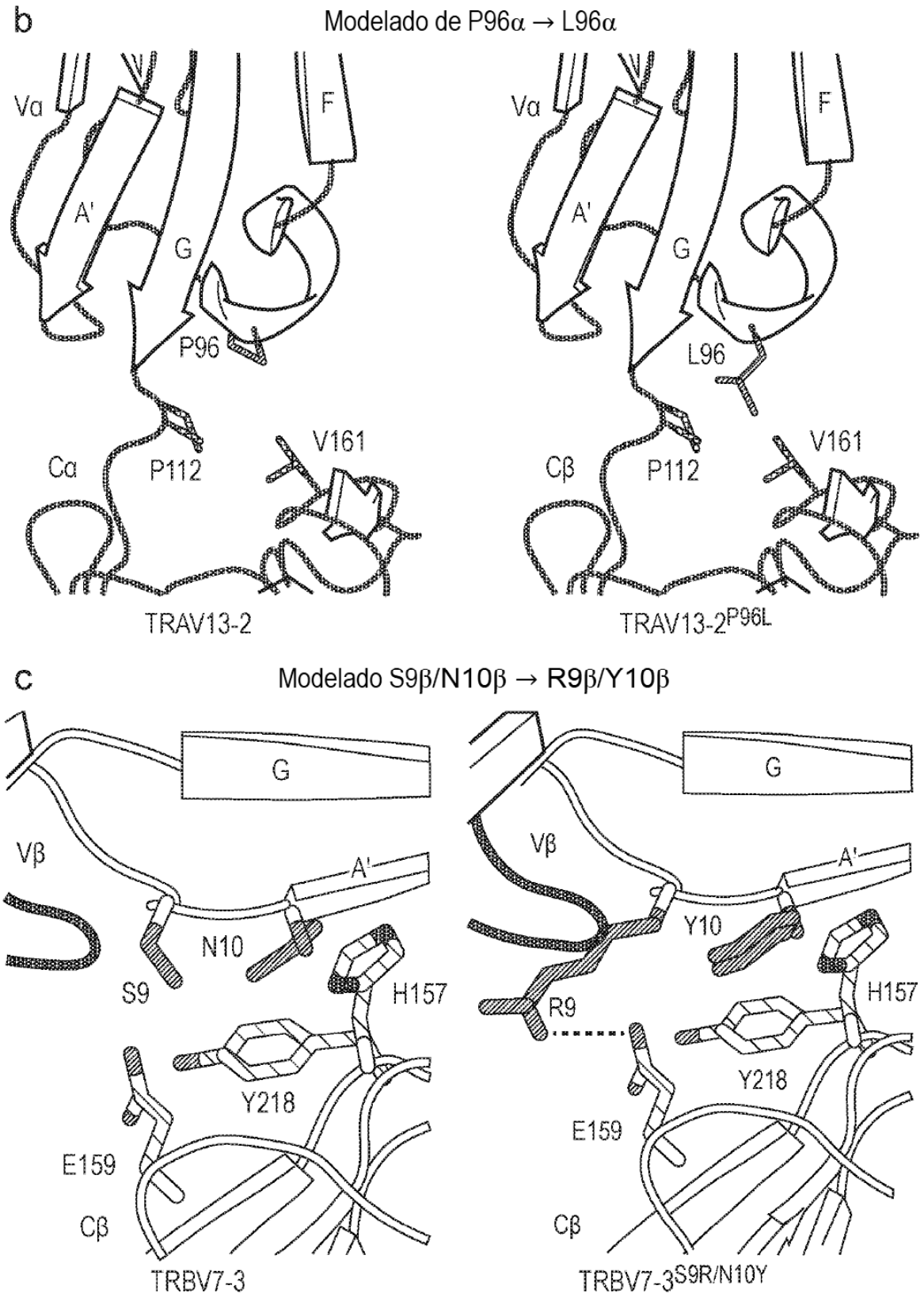


FIG. 25 (Continuación)

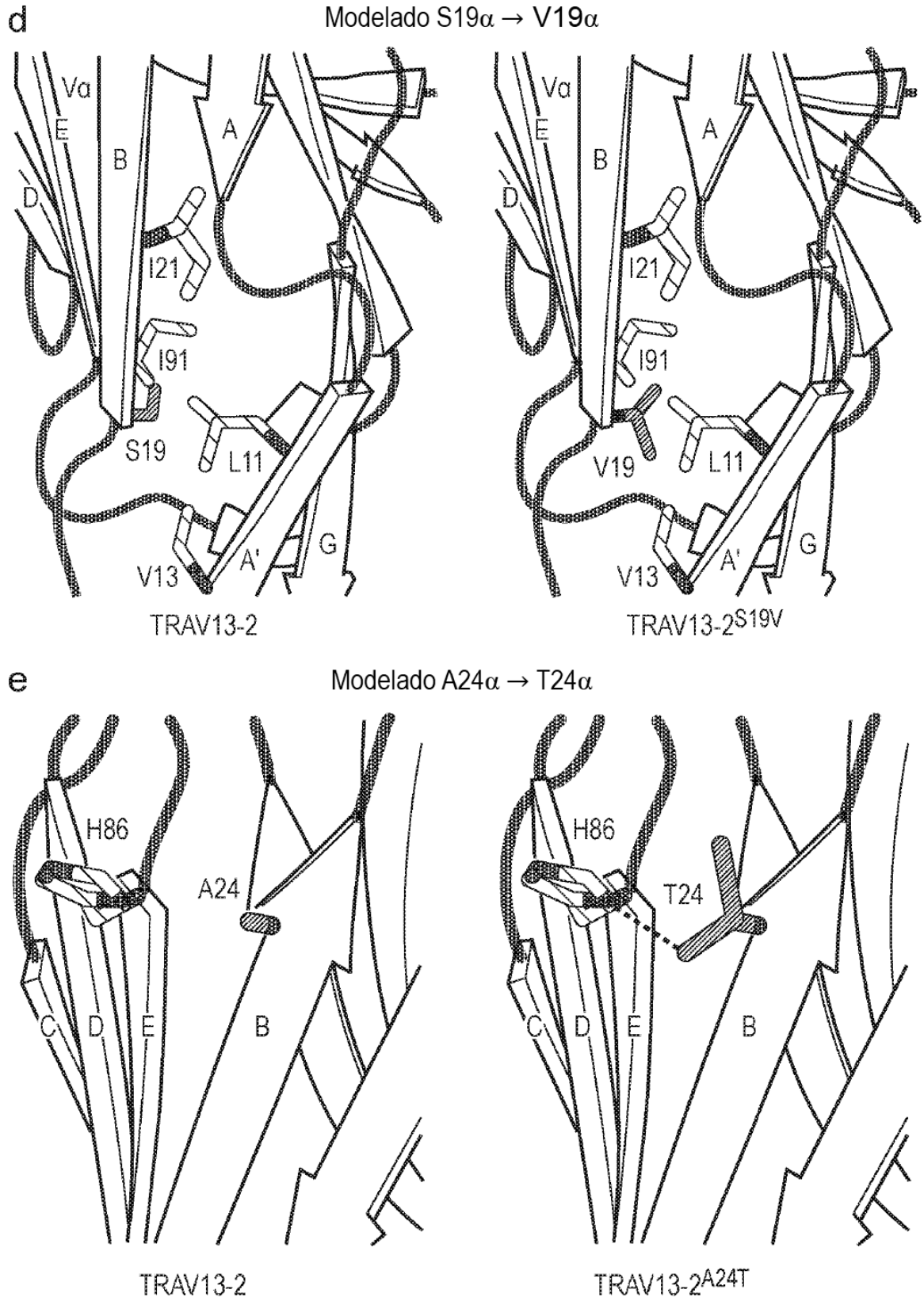


FIG. 25 (Continuación)

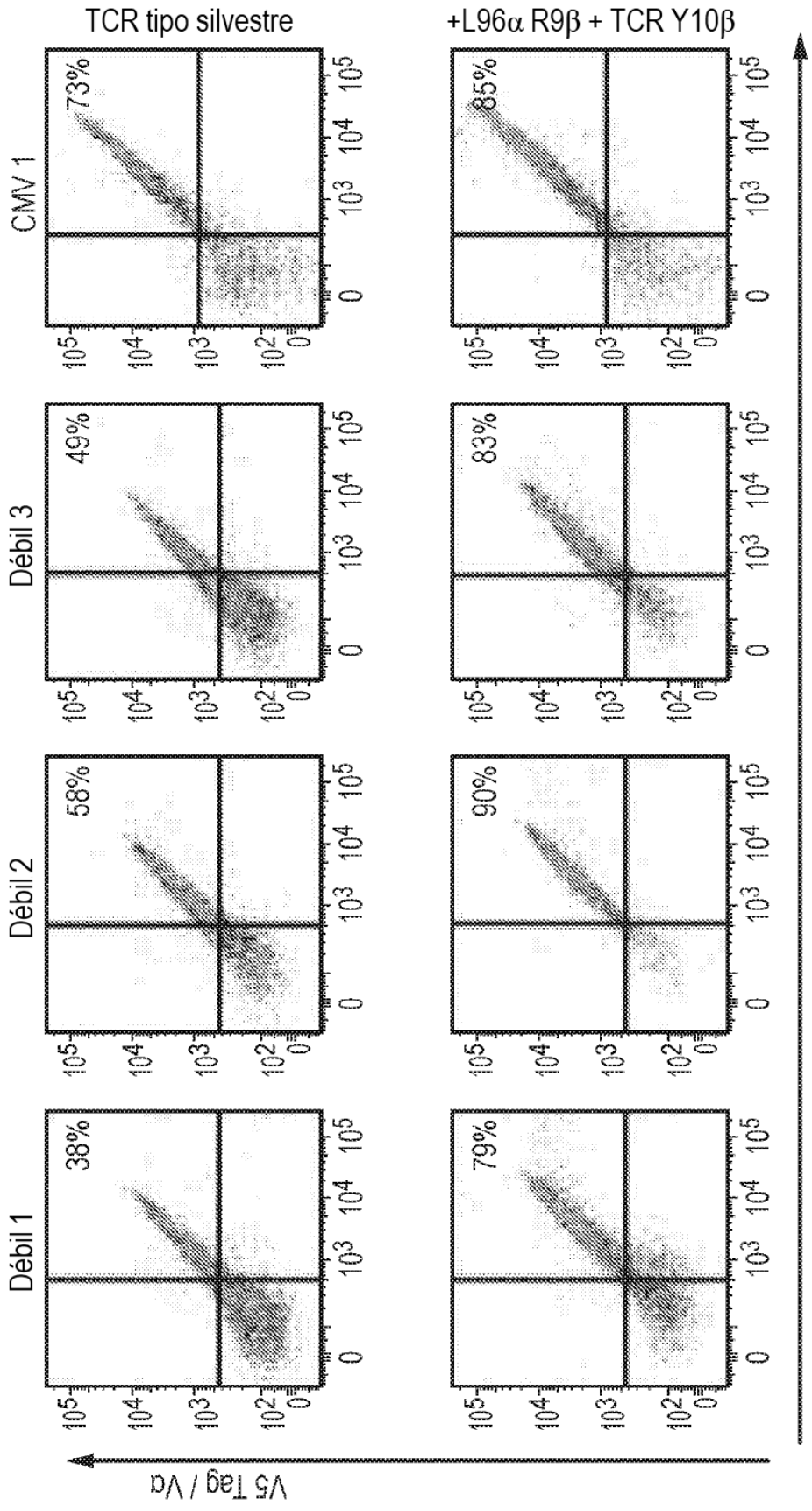

TCR tipo silvestre
+L96α R9β + TCR Y10β
CMV 1
Débil 3
Débil 2
Débil 1
73%
85%
49%
83%
58%
90%
38%
79%
V5 Tag / Vα
Myc Tag / Vβ

FIG. 26a

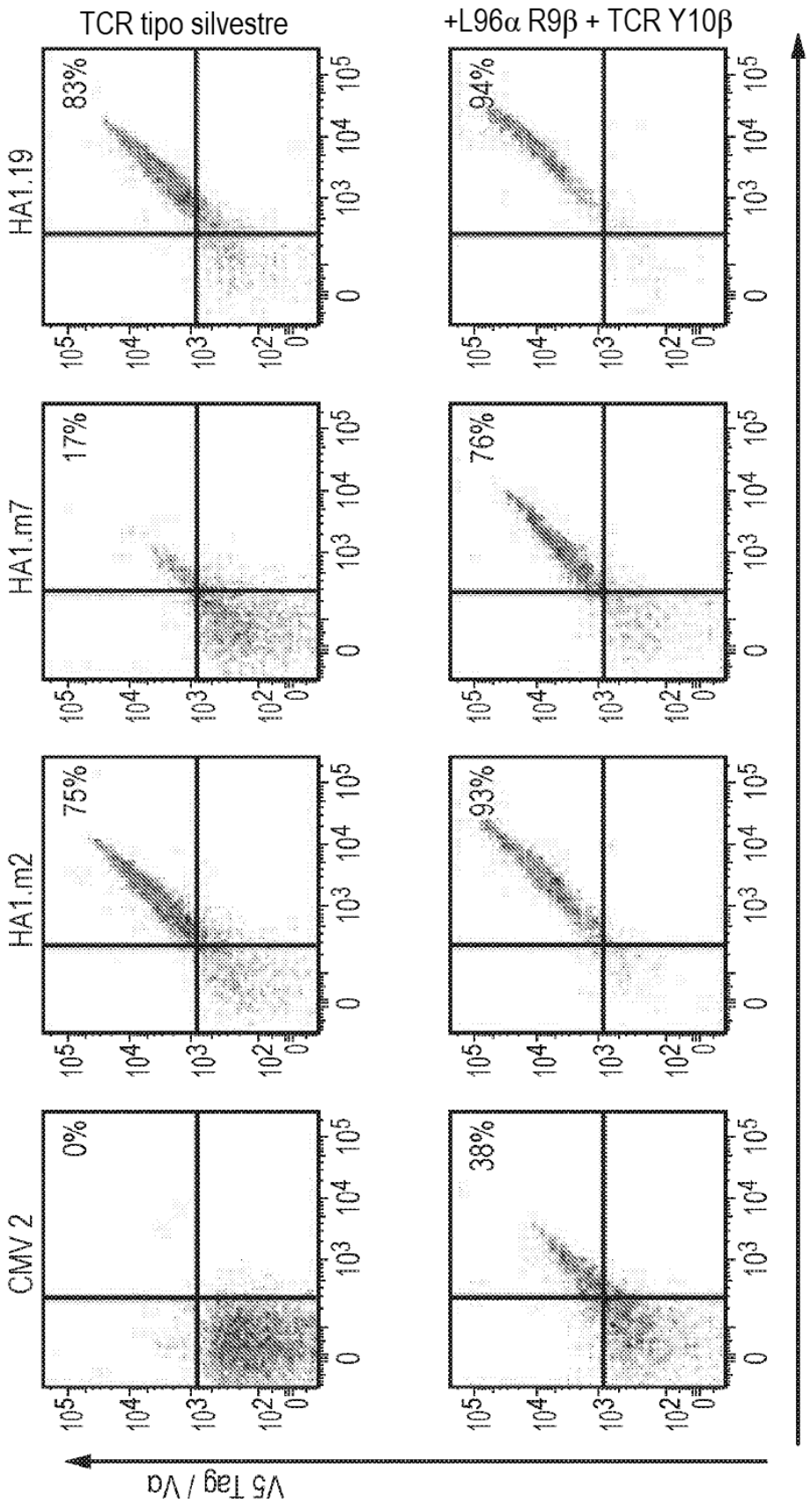


FIG. 26a (Continuación)

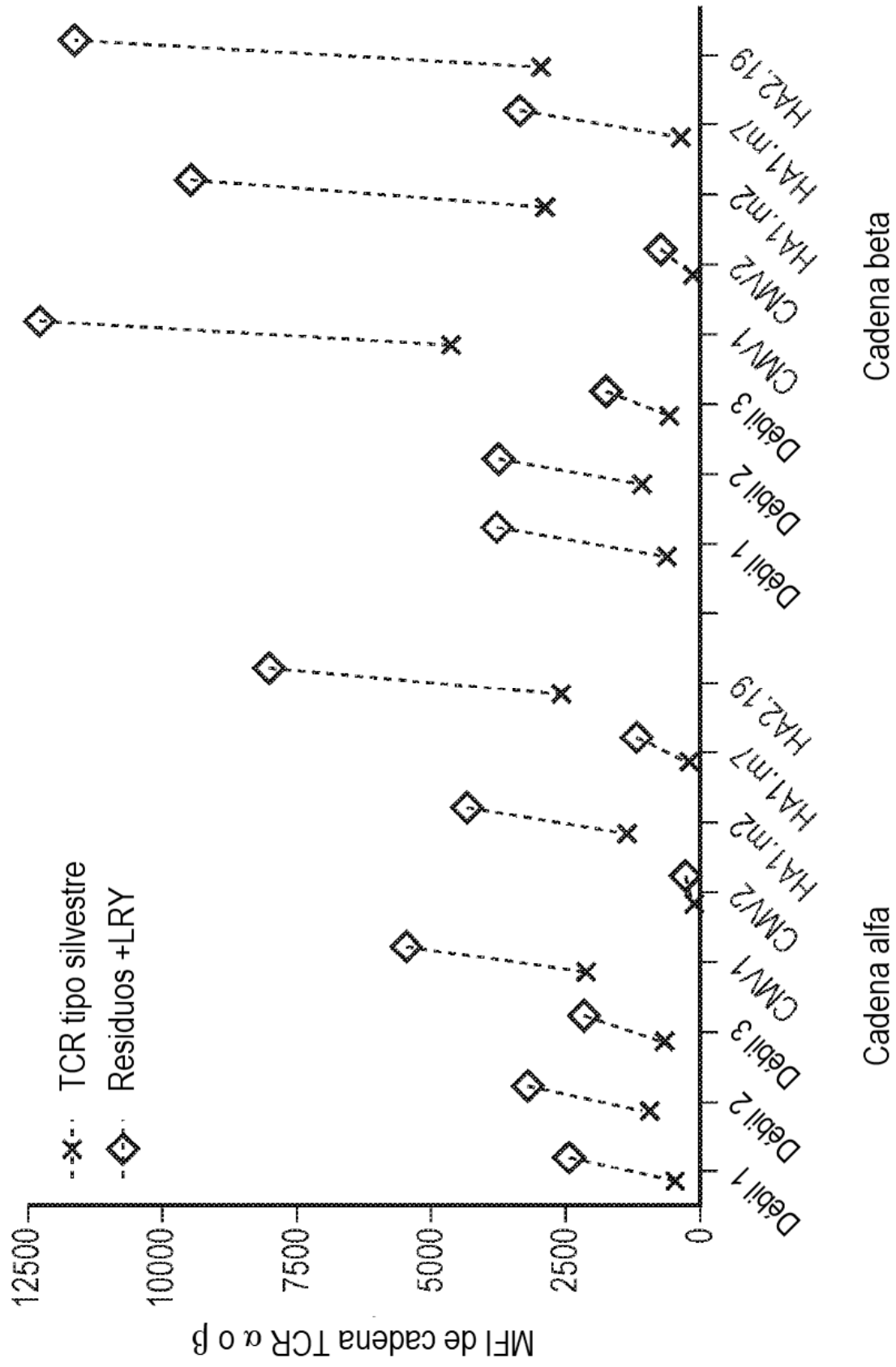

MFI de cadena TCR α o β
12500
10000
7500
5000
2500
0
TCR tipo silvestre
Residuos +LRY
Débil 1
Débil 2
Débil 3
CMV1
CMV2
HA1.M2
HA1.M7
HA2.19
Cadena alfa
Cadena beta

FIG. 26b

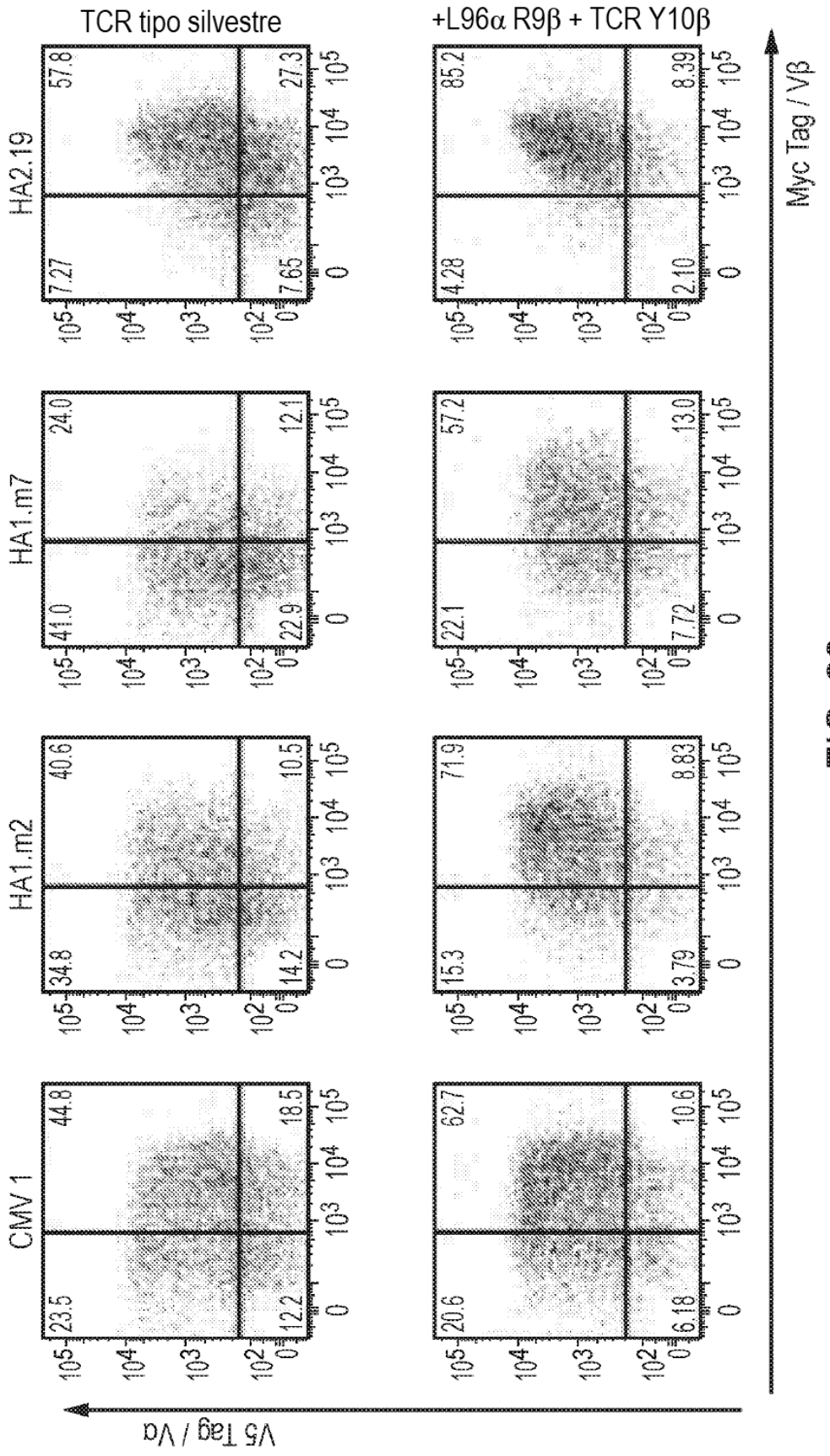

TCR tipo silvestre
+L96α R9β + TCR Y10β
HA2.19
HA1.m7
HA1.m2
CMV 1
V5 Tag / Vα
Myc Tag / Vβ
57.8
27.3
7.27
7.65
85.2
8.39
4.28
2.10
24.0
12.1
41.0
22.9
57.2
13.0
22.1
7.72
40.6
10.5
34.8
14.2
71.9
8.83
15.3
3.79
44.8
18.5
23.5
12.2
62.7
10.6
20.6
6.18

FIG. 26c

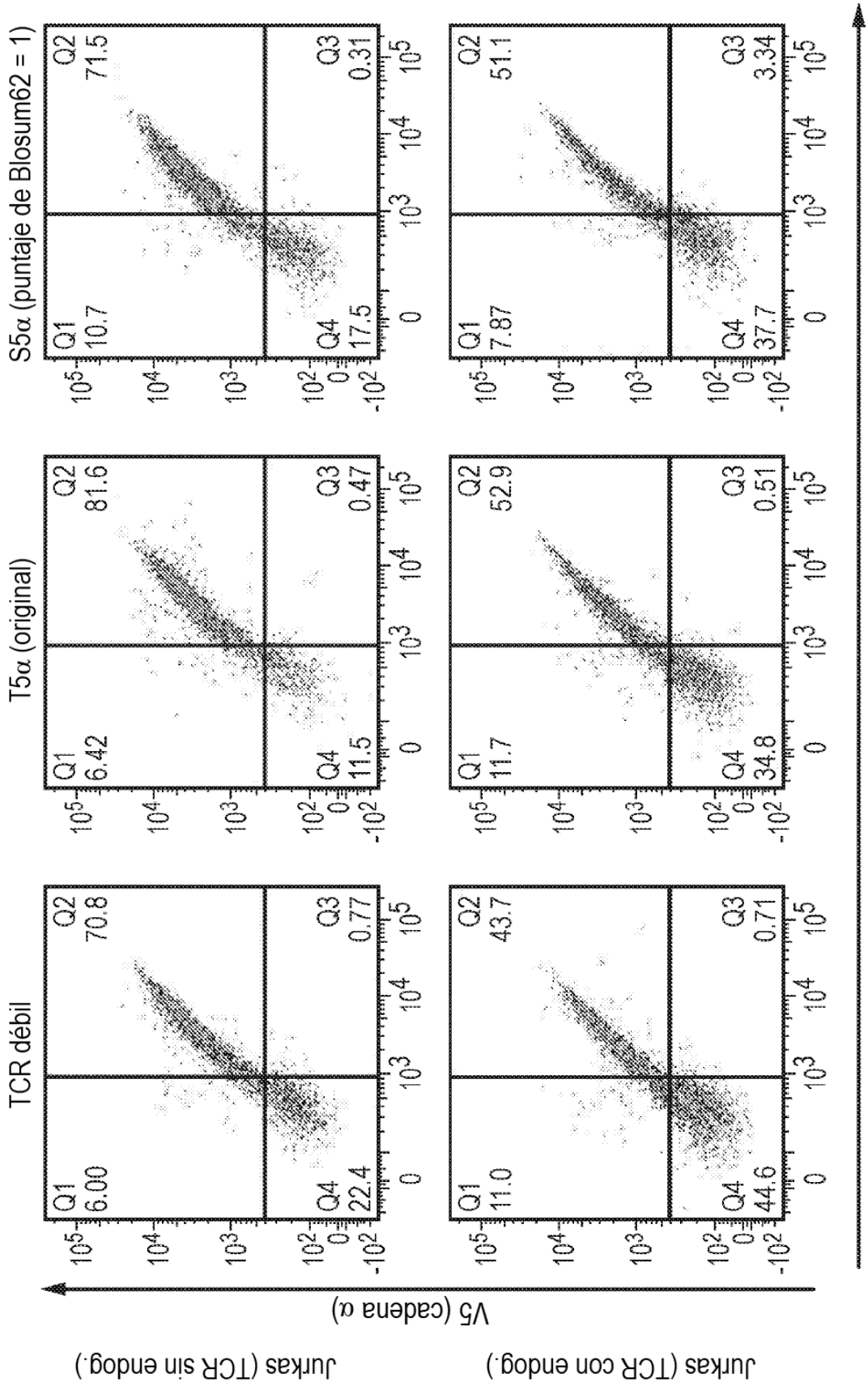

TCR débil
T5α (original)
S5α (puntaje de Blosum62 = 1)
Q1 6.00
Q2 70.8
Q3 0.77
Q4 22.4
Q1 6.42
Q2 81.6
Q3 0.47
Q4 11.5
Q1 10.7
Q2 71.5
Q3 0.31
Q4 17.5
Q1 11.0
Q2 43.7
Q3 0.71
Q4 44.6
Q1 11.7
Q2 52.9
Q3 0.51
Q4 34.8
Q1 7.87
Q2 51.1
Q3 3.34
Q4 37.7
Jurkas (TCR sin endog.)
Jurkas (TCR con endog.)
Vβ5 (cadena α)
Myc (cadena β)

FIG. 27

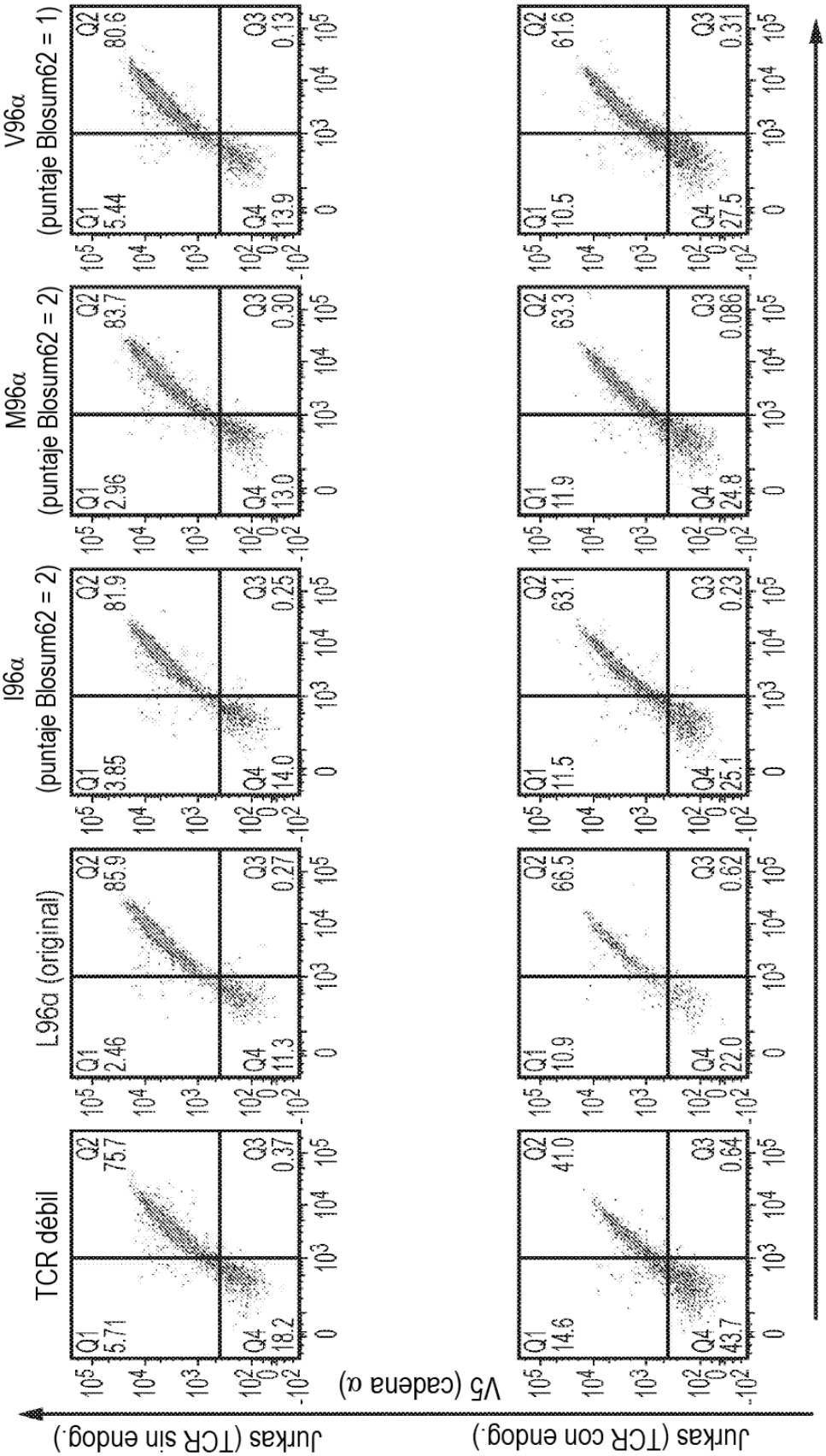


FIG. 27 (Continuación)

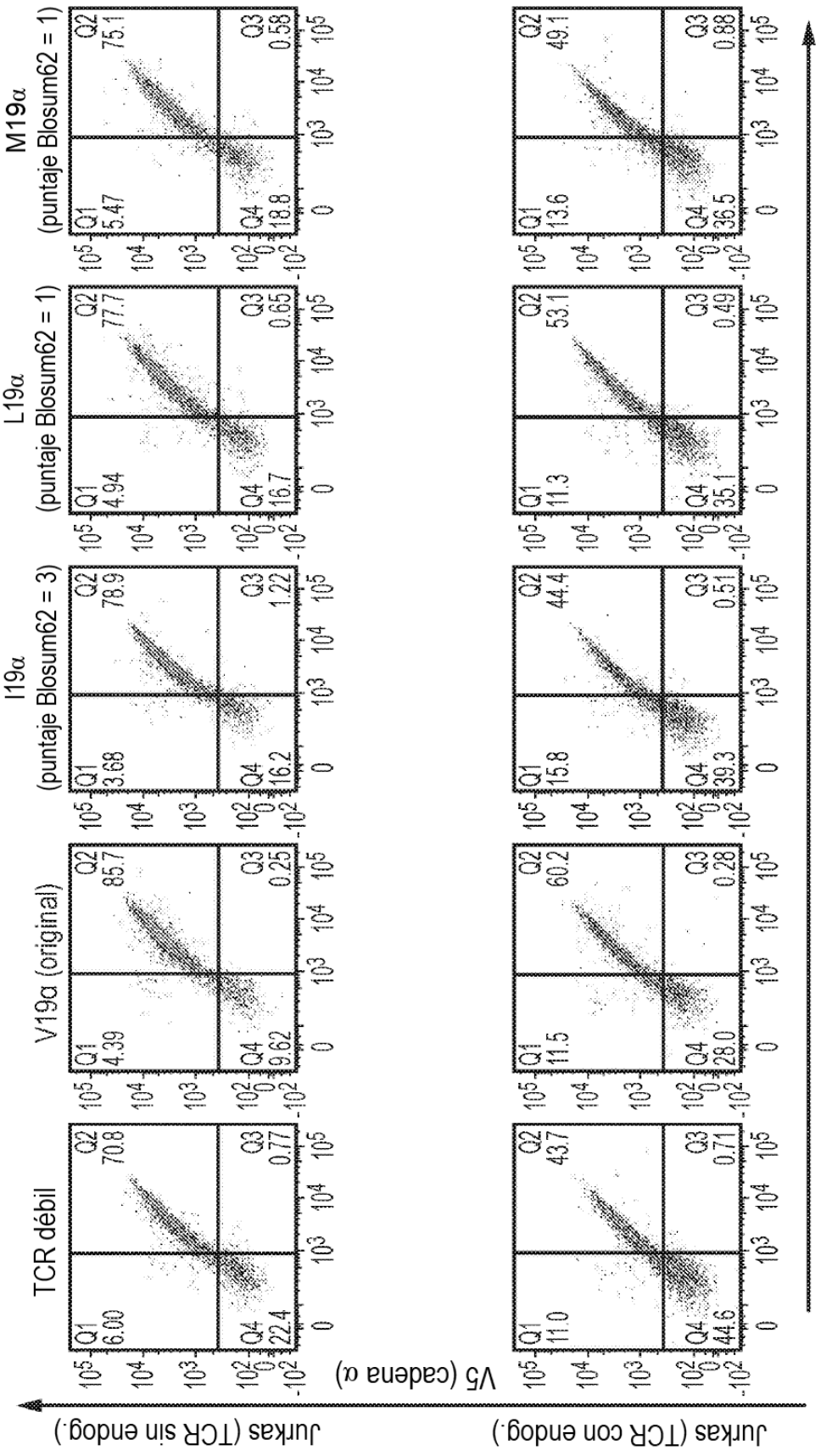


FIG. 27 (Continuación)

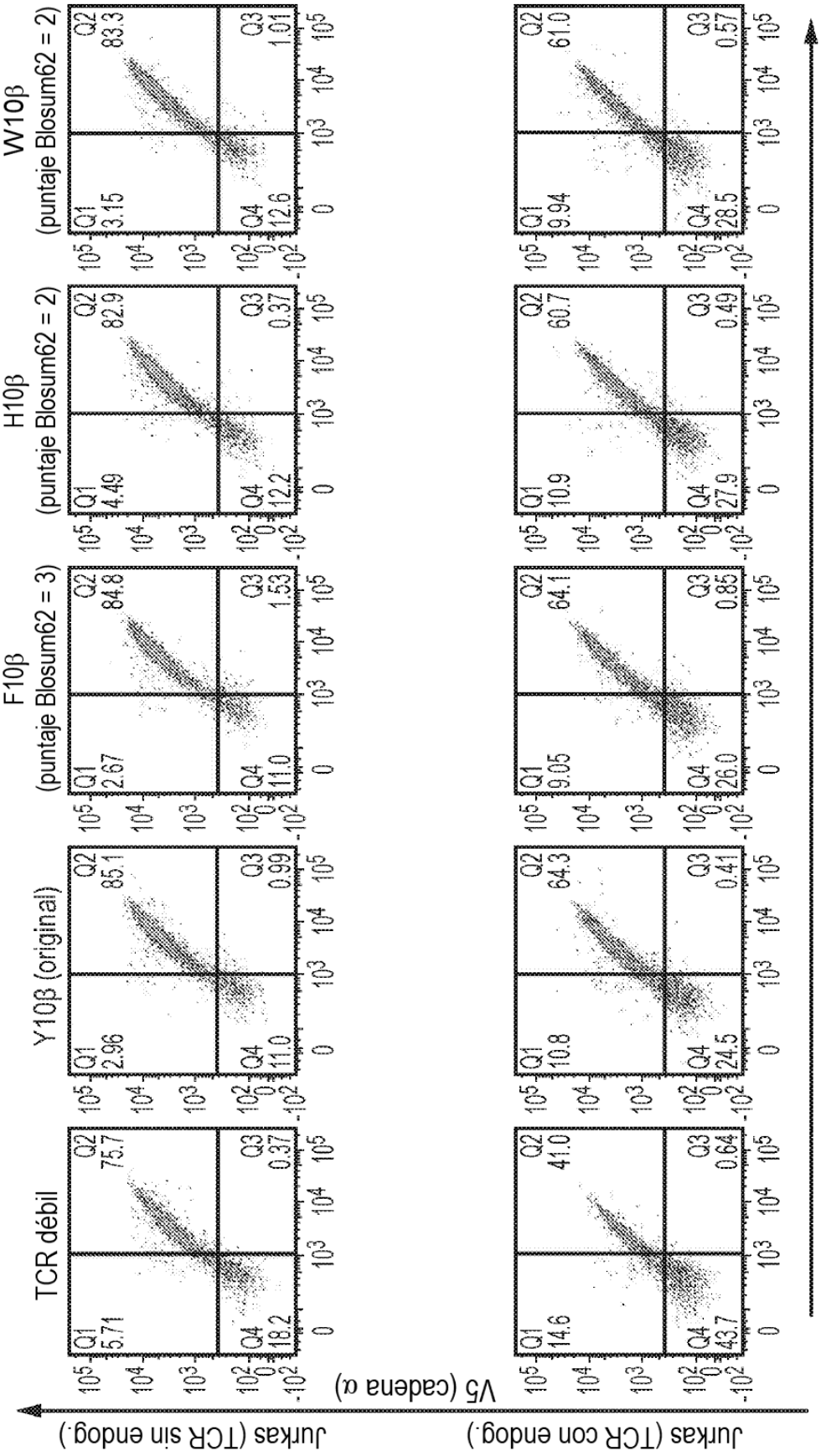


FIG. 27 (Continuación)

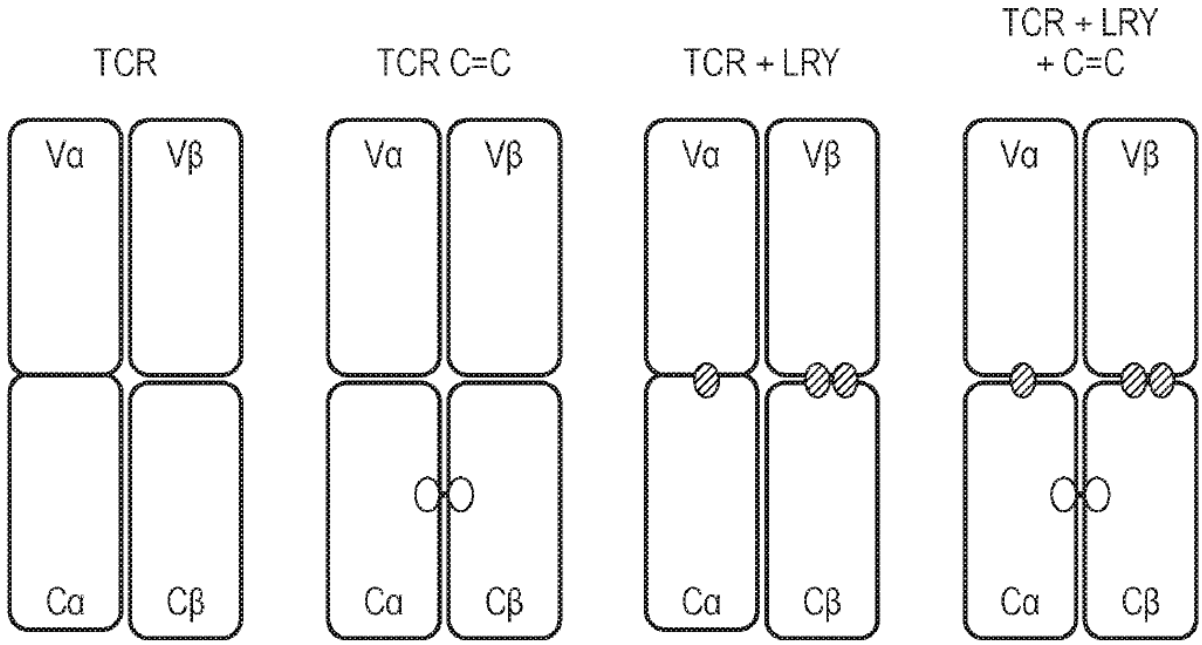


FIG. 28

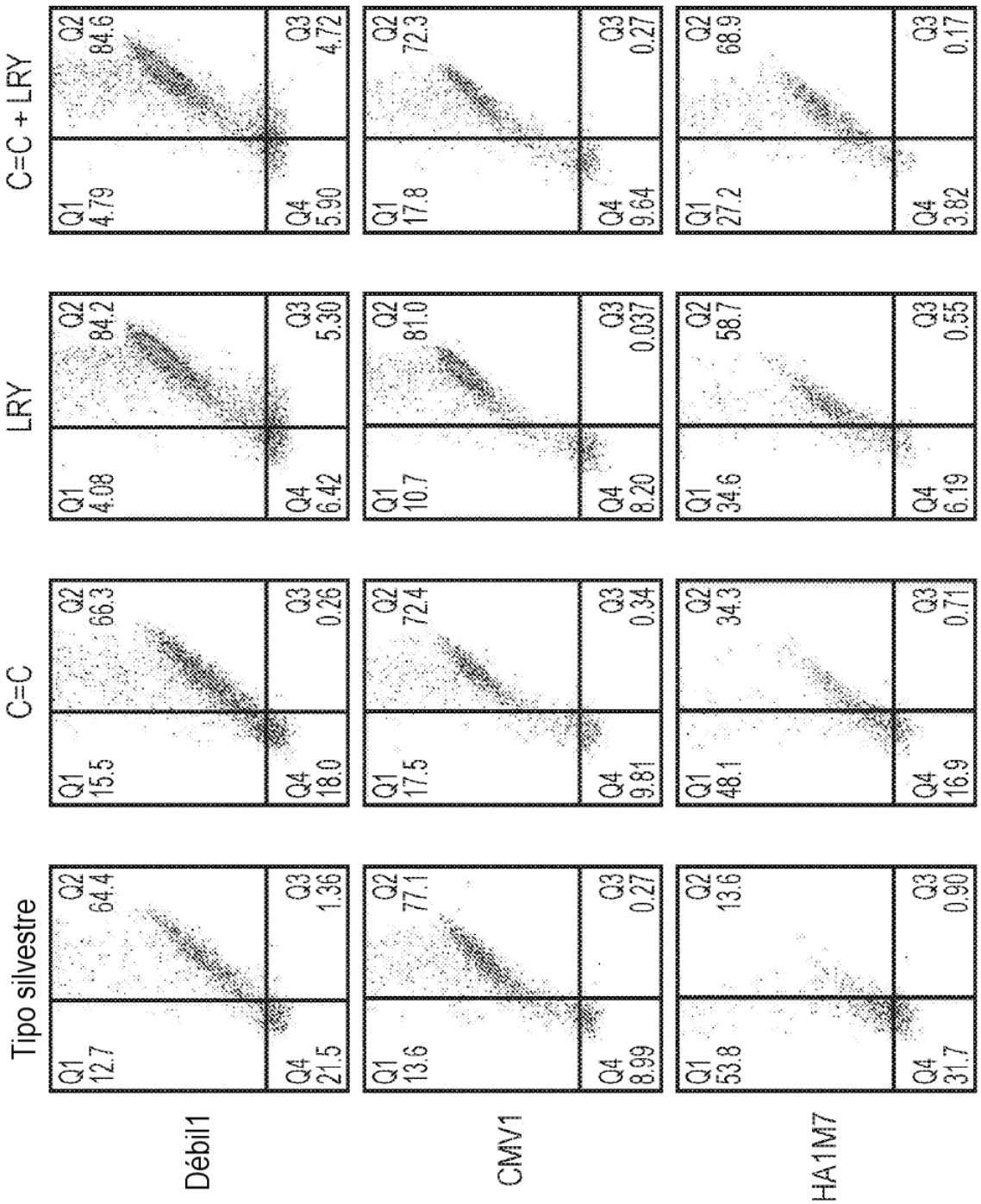

Tipo silvestre
C=C
LRY
C=C + LRY
Débil1
CMV1
HA1M7
Q1 12.7
Q2 64.4
Q3 1.36
Q4 21.5
Q1 15.5
Q2 66.3
Q3 0.26
Q4 18.0
Q1 4.08
Q2 84.2
Q3 5.30
Q4 6.42
Q1 4.79
Q2 84.6
Q3 4.72
Q4 5.90
Q1 13.6
Q2 77.1
Q3 0.27
Q4 8.99
Q1 17.5
Q2 72.4
Q3 0.34
Q4 9.81
Q1 10.7
Q2 81.0
Q3 0.037
Q4 8.20
Q1 17.8
Q2 72.3
Q3 0.27
Q4 9.64
Q1 53.8
Q2 13.6
Q3 0.90
Q4 31.7
Q1 48.1
Q2 34.3
Q3 0.71
Q4 16.9
Q1 34.6
Q2 58.7
Q3 0.55
Q4 6.19
Q1 27.2
Q2 68.9
Q3 0.17
Q4 3.82

FIG. 29

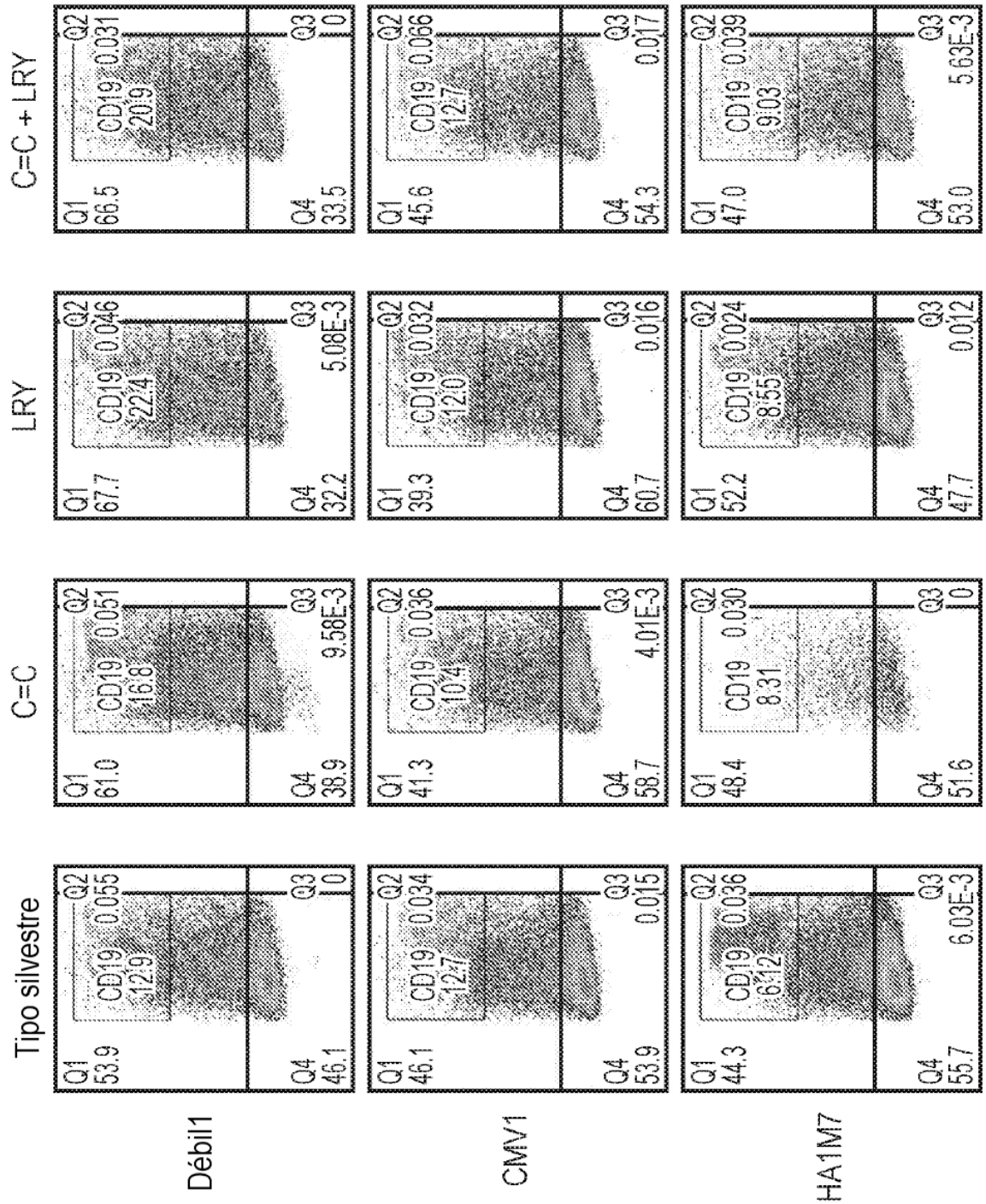

Tipo silvestre
C=C
LRY
C=C + LRY
Débil1
CMV1
HA1M7
Q1 53.9
CD19 0.055 12.9
Q2
Q4 46.1
Q3 1.0
Q1 61.0
CD19 0.051 16.8
Q2
Q4 38.9
Q3 9.58E-3
Q1 67.7
CD19 0.046 22.4
Q2
Q4 32.2
Q3 5.08E-3
Q1 66.5
CD19 0.031 20.9
Q2
Q4 33.5
Q3 1.0
Q1 46.1
CD19 0.034 12.7
Q2
Q4 53.9
Q3 0.015
Q1 41.3
CD19 0.036 10.4
Q2
Q4 58.7
Q3 4.01E-3
Q1 39.3
CD19 0.032 12.0
Q2
Q4 60.7
Q3 0.016
Q1 45.6
CD19 0.066 12.7
Q2
Q4 54.3
Q3 0.017
Q1 44.3
CD19 0.036 6.12
Q2
Q4 55.7
Q3 6.03E-3
Q1 48.4
CD19 0.030 8.31
Q2
Q4 51.6
Q3 1.0
Q1 52.2
CD19 0.024 8.55
Q2
Q4 47.7
Q3 0.012
Q1 47.0
CD19 0.039 9.03
Q2
Q4 53.0
Q3 5.63E-3

FIG. 30

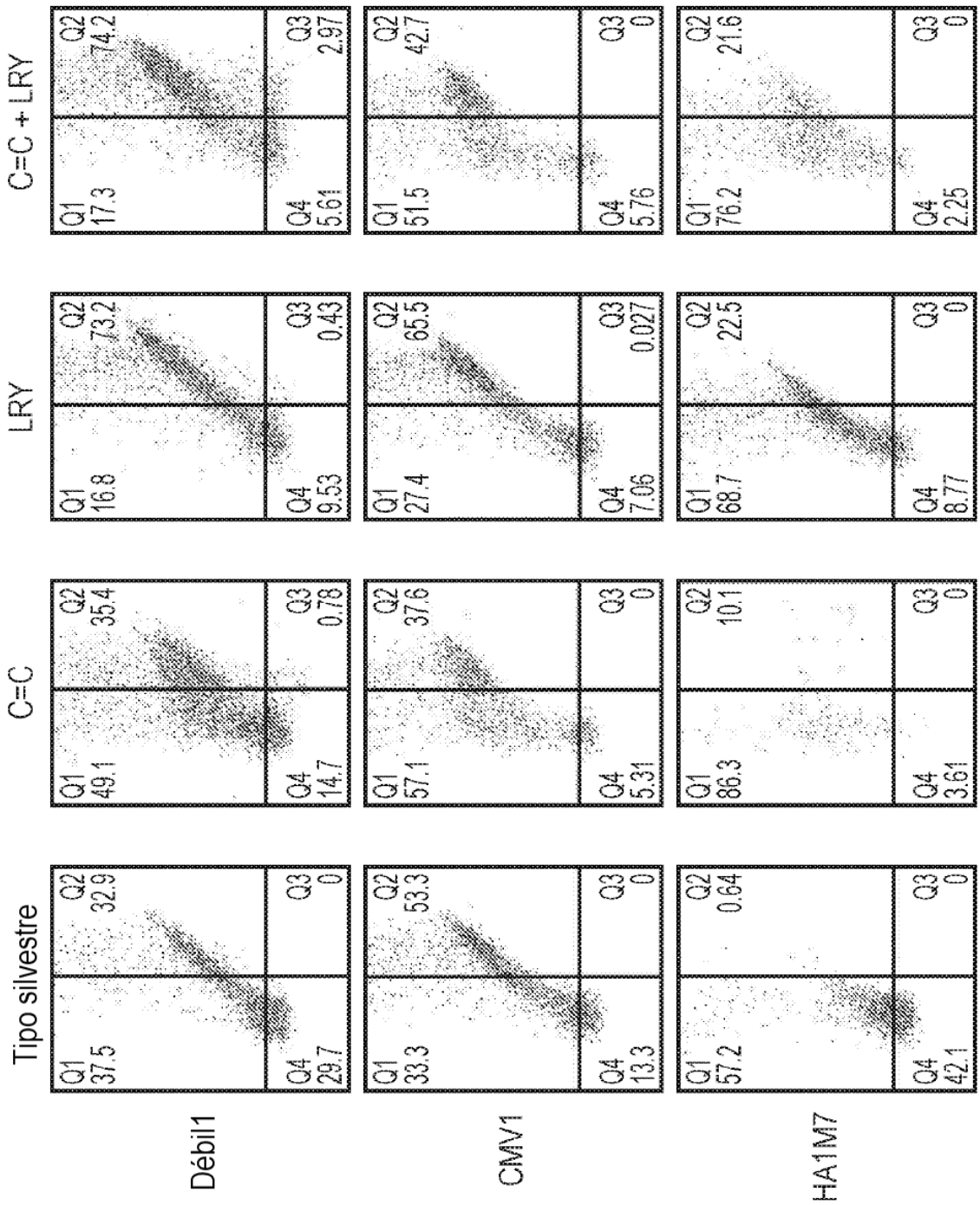

Tipo silvestre
C=C
LRY
C=C + LRY
Débil1
CMV1
HA1M7
Q1 37.5
Q2 32.9
Q4 29.7
Q3 0
Q1 49.1
Q2 35.4
Q4 14.7
Q3 0.78
Q1 16.8
Q2 73.2
Q4 9.53
Q3 0.43
Q1 17.3
Q2 74.2
Q4 5.61
Q3 2.97
Q1 33.3
Q2 53.3
Q4 13.3
Q3 0
Q1 57.1
Q2 37.6
Q4 5.31
Q3 0
Q1 27.4
Q2 65.5
Q4 7.06
Q3 0.027
Q1 51.5
Q2 42.7
Q4 5.76
Q3 0
Q1 57.2
Q2 0.64
Q4 42.1
Q3 0
Q1 86.3
Q2 10.1
Q4 3.61
Q3 0
Q1 68.7
Q2 22.5
Q4 8.77
Q3 0
Q1 76.2
Q2 21.6
Q4 2.25
Q3 0

FIG. 31