

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 944**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 4/12 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2016** **PCT/GB2016/053658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17089776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2016** **E 16805193 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021** **EP 3380502**

54 Título: **Péptidos**

30 Prioridad:

23.11.2015 GB 201520544

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

21.12.2021

73 Titular/es:

IMMUNOCORE LIMITED (50.0%)
92 Park Drive Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB y
ADAPTImmune Limited (50.0%)

72 Inventor/es:

POWLESland, ALEX y
CHESTER, FIONA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 886 944 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos

La presente invención se refiere a novedosos péptidos derivados del antígeno B2 asociado al melanoma (MAGEB2), a complejos que comprenden tales péptidos unidos a moléculas MHC recombinantes y a células que presentan dicho péptido en complejo con moléculas MHC. La presente invención también proporciona fracciones de unión que se unen a los péptidos y/o complejos de la invención. Tales fracciones son útiles para el desarrollo de reactivos inmunoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

Las células T son una parte clave del brazo celular del sistema inmunitario. Reconocen específicamente fragmentos peptídicos derivados de proteínas intracelulares y presentados en complejo con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). En los seres humanos, las moléculas MHC se conocen como antígenos leucocitarios humanos (HLA), y ambos términos se utilizan en el presente documento como sinónimos. Las moléculas del MHC tienen un surco de unión en el que se unen los fragmentos peptídicos. El reconocimiento de antígenos de péptido-MHC particulares está mediado por el correspondiente receptor de células T (TCR). Las células tumorales expresan diversos antígenos asociados al tumor (TAA) y los péptidos derivados de estos antígenos pueden aparecer en la superficie de las células tumorales. La detección de un péptido derivado del TAA representado por el MHC de clase I por una célula T CD8+ que porta el correspondiente receptor de células T, conduce a la eliminación selectiva de la célula tumoral. Sin embargo, como consecuencia de los procesos de selección que tienen lugar durante la maduración de las células T en el timo, hay una escasez de células T (y TCRs) en el repertorio circulante, que reconocen los péptidos derivados de TAA con un nivel de afinidad suficientemente alto. Por lo tanto, las células tumorales a menudo escapan a la detección.

La identificación de péptidos particulares derivados de TAA presentados por las moléculas MHC en las células tumorales permite el desarrollo de novedosos reactivos inmunoterapéuticos diseñados para dirigirse específicamente a dichas células tumorales y destruirlas. Tales reactivos pueden ser fracciones que unen al péptido derivado de la TAA y/o a complejos de péptido y MHC, y suelen funcionar induciendo una respuesta de las células T. Por ejemplo, tales reactivos pueden basarse, exclusivamente, o en parte, en células T, o en receptores de células T (TCR), o en anticuerpos. La identificación de los TAA adecuados para el direccionamiento terapéutico requiere una cuidadosa consideración para mitigar la toxicidad fuera del tumor en el objetivo en un entorno clínico. Los TAA que son adecuados como dianas para la intervención inmunoterapéutica deben mostrar una diferencia suficiente en los niveles de expresión entre el tejido tumoral y los tejidos normales y sanos; en otras palabras, debe haber una ventana terapéutica adecuada, que permita direccionarse al tejido tumoral y minimizar el direccionamiento a los tejidos sanos. Lo ideal es que los TAA se expresen en gran medida en el tejido tumoral y tengan una expresión limitada o nula en el tejido sano normal. Típicamente, un experto en la técnica utilizaría los datos de expresión de proteínas para identificar si existe una ventana terapéutica para un determinado TAA. Una expresión más elevada de la proteína es indicativa de niveles más elevados de péptido presentado en péptido-MHC sobre la superficie celular. Los inventores de la presente solicitud han encontrado que las diferencias en la expresión de ARN, en lugar de la expresión de proteínas, es un indicador más fiable de los niveles de pMHC y, por consiguiente, de la ventana terapéutica.

Por lo tanto, es deseable proporcionar péptidos derivados de los TAA con una ventana terapéutica adecuada, basada en la expresión del ARN, los complejos MHC de los mismos y los fracciones de unión que puedan utilizarse para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Además, es deseable que dichos péptidos no sean idénticos a, o altamente similares a cualquier otro péptido restringido por el MHC, derivado de una(s) proteína(s) alternativa(s), y presentado por el MHC en la superficie de las células no cancerosas. La existencia de estos péptidos imitadores aumenta el riesgo de toxicidad in vivo de las terapias direccionadas contra el cáncer.

Los algoritmos *in silico*, tales como SYFPETHEI (Rammensee, et al., Immunogenetics. 1999 Nov; 50(3-4):213-9 (acceso a través de www.syfpeithi.de) y BIMAS (Parker, et al., J. Immunol. 1994 Jan 1;152(1):163-75 (acceso a través de http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) están disponibles para predecir las secuencias de aminoácidos de los péptidos derivados de las proteínas presentados por el MHC. Sin embargo, se sabe que estos procedimientos generan una alta proporción de falsos positivos (ya que simplemente definen la probabilidad de que un péptido determinado pueda unirse a un MHC determinado y no tienen en cuenta el procesamiento intracelular). Por lo tanto, no es posible predecir con exactitud si un determinado péptido-MHC es realmente presentado por las células tumorales. Normalmente se necesitan datos experimentales directos.

MAGEB2 (también conocido como antígeno B2 o CT3.2 o DAM6 asociado a melanoma y que tiene número de acceso Uniprot O15479) pertenece a la familia de cáncer/testículo de antígenos tumorales codificados en la línea germinal. MAGE B2 puede funcionar para potenciar la actividad de la ubiquitina ligasa de las ligasas de proteína de ubiquitina E3 que contienen dedos de zinc tipo RING (Doyle et al. Mol Cell. 2010 Sep 24;39(6):963-74). Se ha informado de la expresión de MAGEB2 en diversos tumores, mientras que la expresión en los tejidos normales se limita a la placenta y los testículos (Lurquin et al. Genómica. 1997 Dic 15;46(3):397-408). Por tanto, MAGEB2 es una diana especialmente atractiva para la intervención terapéutica. Los inventores han encontrado que MAGEB2 tiene una ventana terapéutica particularmente adecuada basada en la expresión del ARN. Los inventores han encontrado novedosos péptidos derivados de MAGEB2 que se presentan en la superficie celular en complejo con el MHC. Estos péptidos son particularmente útiles para el desarrollo de reactivos que puedan direccionarse a las células que expresan MAGEB2

y para el tratamiento de cánceres, incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas (escamosas), de esófago, de hígado y de cabeza y cuello.

En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en la que el polipéptido forma un complejo con una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Los inventores han encontrado que el polipéptido de la invención es presentado por el MHC en la superficie de las células tumorales. En consecuencia, el polipéptido de la invención, así como las fracciones que se unen a los complejos polipéptido-MHC, pueden utilizarse para desarrollar reactivos terapéuticos.

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
5	KVLEFLAKV

Como se sabe en la técnica, la capacidad de un péptido para formar un complejo inmunogénico con un tipo de MHC dado, y por lo tanto activar las células T, está determinada por la estabilidad y la afinidad de la interacción péptido-MHC (van der Burg et al. J Immunol. 1996 Mayo 1;156(9):3308-14). El experto puede, por ejemplo, determinar si un polipéptido dado forma o no un complejo con una molécula del MHC determinando si el MHC puede replegarse en presencia del polipéptido utilizando el proceso expuesto en el Ejemplo 2. Si el polipéptido no forma un complejo con el MHC, éste no se replegará. El repliegue se suele confirmar utilizando un anticuerpo que reconoce el MHC sólo en estado plegado. Se pueden encontrar más detalles en Garboczi et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Abr 15;89(8):3429-33. Alternativamente, la persona con experiencia puede determinar la capacidad de un péptido para estabilizar el MHC en la superficie de líneas celulares deficientes en TAP, tales como las células T2, u otros procedimientos biofísicos para determinar los parámetros de interacción (Harndahl et al. J Biomol Screen. 2009 Feb;14(2):173-80).

Se divulga en el presente documento un péptido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en

(a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-4, o

(b) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-4 con la excepción de 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, y/o 1, 2 o 3 inserciones de aminoácidos, y/o 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos,

en el que el péptido forma un complejo con una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
1	EEIWEFLNML
2	SVFGEPWKLITK
3	REHFPEILKKA
4	SVFGEPWKL

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

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden consistir o consistir esencialmente en las secuencias de aminoácidos proporcionadas en las SEQ ID NOS: 1-4.

Los residuos de aminoácidos que comprenden los péptidos divulgados en el presente documento pueden ser modificados químicamente. Ejemplos de modificaciones químicas incluyen las correspondientes a las modificaciones postraduccionales, por ejemplo la fosforilación, la acetilación y la desamidación (Engelhard et al., Curr Opin Immunol. 2006 Feb;18(1):92-7). Las modificaciones químicas pueden no corresponder a las que pueden estar presentes *in vivo*. Por ejemplo, los extremos terminales N o C del péptido pueden modificarse para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos (véase, por ejemplo, Brinckerhoff et al Int J Cancer. 1999 Oct 29;83(3):326-34). Otros ejemplos de modificaciones no naturales incluyen la incorporación de α -aminoácidos no codificados, aminoácidos reticulados fotorreactivos, aminoácidos N-metilados y β -aminoácidos, reducción de la

columna vertebral, retroinversión mediante el uso de d-aminoácidos, metilación N-terminal y amidación C-terminal y pegilación.

La sustitución de aminoácidos significa que un residuo de aminoácidos es sustituido por un residuo de aminoácidos de reemplazo en la misma posición. Los residuos de aminoácidos insertados pueden insertarse en cualquier posición y pueden insertarse de manera que algunos o todos los residuos de aminoácidos insertados sean inmediatamente adyacentes entre sí o pueden insertarse de manera que ninguno de los residuos de aminoácidos insertados sea inmediatamente adyacente a otro residuo de aminoácido insertado. Uno, dos o tres aminoácidos pueden ser eliminados de la secuencia de las SEQ ID NOs: 1-4. Cada supresión puede tener lugar en cualquier posición de las SEQ ID NOs: 1-4.

Los polipéptidos divulgados en el presente documento pueden comprender uno, dos o tres aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal y/o en el extremo N-terminal de la secuencia de las SEQ ID NOs: 1-4. Un polipéptido divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-4 con la excepción de una sustitución de aminoácidos y una inserción de aminoácidos, una sustitución de aminoácidos y una eliminación de aminoácidos, o una inserción de aminoácidos y una eliminación de aminoácidos. Un polipéptido divulgado en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-4, con la excepción de una sustitución de aminoácidos, una inserción de aminoácidos y una eliminación de aminoácidos.

Los aminoácidos insertados y los aminoácidos de sustitución pueden ser aminoácidos de origen natural o pueden ser aminoácidos no naturales y, por ejemplo, pueden contener una cadena lateral no natural, y/o estar unidos mediante enlaces peptídicos no naturales. Tales ligandos peptídicos alterados se analizan con más detalle en Douat-Casassus et al., J. Med. Chem. 2007 Abr 5;50(7):1598-609 y Hoppes et al., J. Immunol 2014 Nov 15;193(10):4803-13 y sus referencias). Si se sustituye y/o inserta más de un residuo de aminoácido, los residuos de aminoácidos sustituidos/insertados pueden ser iguales o diferentes entre sí. Cada aminoácido de sustitución puede tener una cadena lateral diferente a la del aminoácido sustituido.

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

Preferentemente, el polipéptido de la invención se une al MHC en el surco de unión del péptido de la molécula del MHC. Por lo general, las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente no perjudicarán la capacidad del péptido para unirse al MHC. Las modificaciones de aminoácidos pueden mejorar preferentemente la capacidad del péptido para unirse al MHC. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones en las posiciones que anclan el péptido al MHC. Tales posiciones de anclaje y los residuos preferidos en estos lugares son conocidos en la técnica, en particular para los péptidos que se unen al HLA-A*02 (véase, por ejemplo Parkhurst et al., J. Immunol. 1996 Sep 15;157(6):2539-48 y Parker et al. J Immunol. 1992 Dic 1;149(11):3580-7). Los residuos de aminoácidos en la posición 2, y en el extremo terminal C, del péptido se consideran posiciones de anclaje primarias. Los residuos de anclaje preferidos pueden ser diferentes para cada tipo de HLA. Los aminoácidos preferidos en la posición 2 para el HLA-A*02 son Leu, Ile, Val o Met. En el extremo terminal C, se favorece una valina o una leuquina.

Un polipéptido de la invención puede utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria. Si este es el caso, es importante que la respuesta inmunitaria sea específica para el objetivo previsto con el fin de evitar el riesgo de efectos secundarios no deseados que pueden estar asociados con una respuesta inmunitaria "fuera del objetivo". Por lo tanto, se prefiere que la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención no coincida con la secuencia de aminoácidos de un péptido de cualquier otra(s) proteína(s), en particular, la de otra proteína humana. Una persona con experiencia en la técnica entendería cómo buscar en una base de datos de secuencias proteicas conocidas para determinar si un péptido según la invención está presente en otra proteína.

Los péptidos de la invención pueden conjugarse con fracciones adicionales, tales como moléculas portadoras o adyuvantes, para su uso como vacunas (para ejemplos específicos, véase Liu et al. Bioconjug Chem. 2015 May 20; 26(5): 791-801 y sus referencias). Los péptidos pueden estar biotinilados o incluir una etiqueta, tal como una etiqueta His. Ejemplos de adyuvantes utilizados en las vacunas contra el cáncer incluyen microbios, tales como la bacteria Bacillus Calmette-Guerin (BCG), y/o sustancias producidas por bacterias, tales como Detox B (una emulsión de gotas de aceite de lípido monofosforilico A y esqueleto de pared celular de micobacterias). La KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura) y la albúmina de suero bovino son ejemplos de proteínas portadoras adecuadas que se utilizan en las composiciones de vacunas. Alternativa o adicionalmente, el péptido puede unirse, de forma covalente o de otro modo, a proteínas tales como las moléculas del MHC y/o los anticuerpos (por ejemplo, véase King et al. Cancer Immunol Immunother. 2013 Jun;62(6):1093-105). Alternativa o adicionalmente los péptidos pueden ser encapsulados en liposomas (por ejemplo véase Adamina et al Br J Cancer. 2004 Ene 12;90(1):263-9). Estos péptidos modificados pueden no corresponder a ninguna molécula que exista en la naturaleza.

Un polipéptido de la invención puede sintetizarse fácilmente mediante la síntesis de Merrifield, también conocida como síntesis en fase sólida, o cualquier otra metodología de síntesis de péptidos. El péptido de grado GMP se produce

mediante técnicas de síntesis en fase sólida por Multiple Peptide Systems, San Diego, CA. Así, los péptidos pueden inmovilizarse, por ejemplo, en un soporte sólido como una perla. Alternativamente, el péptido puede ser producido recombinantemente, si así se desea, de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos implican típicamente el uso de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido que se va a expresar, para expresar el polipéptido *in vivo*; por ejemplo, en bacterias, levaduras, insectos o células de mamíferos. Como alternativa, se pueden utilizar sistemas libres de células *in vitro*. Tales sistemas son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Life Technologies, Paisley, Reino Unido. Los péptidos pueden ser aislados y/o pueden ser proporcionados en forma sustancialmente pura. Por ejemplo, pueden proporcionarse en una forma que esté sustancialmente libre de otros péptidos o proteínas.

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

El complejo de la invención puede estar aislado y/o en una forma sustancialmente pura. Por ejemplo, el complejo puede proporcionarse en una forma que esté sustancialmente libre de otros péptidos o proteínas. Cabe señalar que en el contexto de la presente invención, el término "molécula MHC" incluye moléculas MHC recombinantes, moléculas MHC no naturales y fragmentos funcionalmente equivalentes de MHC, incluyendo derivados o variantes de los mismos, siempre que se mantenga la unión al péptido. Por ejemplo, las moléculas MHC pueden estar fusionadas a una fracción terapéutica, unidas a un soporte sólido, en forma soluble, unidas a una etiqueta, biotiniladas y/o en forma multimérica. El péptido puede estar unido covalentemente al MHC.

Los procedimientos para producir moléculas MHC recombinantes solubles con las que los péptidos de la invención pueden formar un complejo son conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, la expresión y purificación a partir de células *E. coli* o células de insectos. En el Ejemplo 2 del presente documento se proporciona un procedimiento adecuado. Alternativamente, las moléculas MHC pueden producirse sintéticamente, o utilizando sistemas libres de células.

El polipéptido y/o los complejos polipéptido-MHC de la invención pueden asociarse (covalentemente o de otra manera) con una fracción capaz de provocar un efecto terapéutico. Tal fracción puede ser una proteína portadora que se sabe que es inmunógena. La KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura) y la albúmina de suero bovino son ejemplos de proteínas portadoras adecuadas utilizadas en las composiciones de vacunas.

Alternativamente, los péptidos y/o complejos péptido-MHC de la invención pueden asociarse con un asociado de fusión. Los asociados de fusión pueden utilizarse con fines de detección, o para fijar dicho péptido o MHC a un soporte sólido, o para la oligomerización del MHC. Los complejos MHC pueden incorporar un sitio de biotinilación al que se puede añadir biotina, por ejemplo, utilizando la enzima BirA (O'Callaghan et al., 1999 Jan 1;266(1):9-15). Otros asociados de fusión adecuados incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes o luminiscentes, radiomarcadores, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste, anticuerpos o enzimas que producen un producto detectable. Los procedimientos de detección pueden incluir la citometría de flujo, la microscopía, la electroforesis o el recuento de centelleo. Los asociados de fusión pueden incluir citoquinas, tales como la interleucina 2, el interferón alfa y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

Los complejos polipeptídicos-MHC de la invención pueden proporcionarse en forma soluble, o pueden inmovilizarse mediante su unión a un soporte sólido adecuado. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, una perla, una membrana, seferosa, una perla magnética, una placa, un tubo, una columna. Los complejos péptido-MHC pueden fijarse a una placa ELISA, a una perla magnética o a un chip biosensor de resonancia de plasmón superficial. Los procedimientos de fijación de complejos péptido-MHC a un soporte sólido son conocidos por la persona con experiencia, e incluyen, por ejemplo, el uso de un par de unión por afinidad, por ejemplo, biotina y estreptavidina, o anticuerpos y antígenos. Los complejos polipeptídicos-MHC pueden marcarse preferentemente con biotina y fijarse a superficies recubiertas de estreptavidina.

Los complejos polipeptídicos-MHC de la invención pueden estar en forma multimérica, por ejemplo, dimérica, o tetramérica, o pentamérica, u octomérica, o mayor. Ejemplos de procedimientos adecuados para la producción de complejos MHC peptídicos multiméricos se describen en Greten et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002 Mar;9(2):216-20 y sus referencias. En general, los multímeros de péptidos-MHC pueden producirse utilizando péptidos-MHC etiquetados con un residuo de biotina y complejados mediante estreptavidina marcada con fluorescencia. Alternativamente, se pueden formar complejos multiméricos péptido-MHC utilizando la inmunoglobulina como andamio molecular. En este sistema, los dominios extracelulares de las moléculas MHC se fusionan con la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina, separadas por un enlace corto de aminoácidos. También se han producido multímeros de péptidos-MHC utilizando moléculas portadoras tales como dextrano (WO02072631). Los complejos

peptídicos MHC multiméricos pueden ser útiles para mejorar la detección de las fracciones de unión, tales como los receptores de células T, que se unen a dicho complejo, debido a los efectos de avidéz.

El polipéptido de la invención puede presentarse en la superficie de una célula en complejo con el MHC. Así, la invención también proporciona una célula que presenta en su superficie un complejo de la invención. Tal célula puede ser una célula de mamífero, preferentemente una célula del sistema inmunitario, y en particular una célula especializada en la presentación de antígenos, tales como una célula dendrítica o una célula B. Otras células preferidas son las células T2 (Hosken, et al., Science. 1990 Abr 20;248(4953):367-70). Las células que presentan el polipéptido o el complejo de la invención pueden aislarse, preferentemente en forma de población, o proporcionarse en una forma sustancialmente pura. Tales células pueden no presentar de forma natural el complejo de la invención, o alternativamente dichas células pueden presentar el complejo a un nivel superior al que tendrían en la naturaleza. Tales células pueden obtenerse pulsando dichas células con el polipéptido de la invención. La pulsación implica la incubación de las células con el polipéptido durante varias horas utilizando concentraciones de polipéptido que típicamente varían entre 10-5 y 10-12 M. Dichas células pueden ser transducidas adicionalmente con moléculas HLA, como HLA-A*02 para inducir adicionalmente la presentación del péptido. Las células pueden producirse de forma recombinante. Las células que presentan péptidos de la invención pueden utilizarse para aislar las células T y los receptores de células T (TCR) que son activados por dichas células o se unen a dichas células, como se describe con más detalle a continuación.

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

Tal molécula de ácido nucleico puede sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Debido a la degeneración del código genético, una persona con conocimientos normales en la técnica apreciará que las moléculas de ácido nucleico de diferente secuencia de nucleótidos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos.

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

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

En el contexto de la presente invención, el término "vector" abarca una molécula de ADN, tal como un plásmido, un bacteriófago, un fagémido, un virus u otro vehículo, que contiene una o más secuencias de nucleótidos heterólogas o recombinantes (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente, bajo el control de un promotor funcional y, posiblemente, también un potenciador) y es capaz de funcionar como un vector en el sentido que entienden los expertos en la técnica. Los fagos y vectores virales adecuados incluyen, pero no se limitan a, bacteriófago lambda (X), bacteriófago EMBL, virus simio 40, virus del papiloma bovino, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus del herpes, virus vaccinia, virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, lentivirus y virus del sarcoma de Rous.

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

El polipéptido y los complejos de la invención pueden utilizarse para identificar y/o aislar fracciones de unión que se unen específicamente al polipéptido y/o al complejo de la invención. Tales moléculas de unión pueden utilizarse como reactivos inmunoterapéuticos y pueden incluir anticuerpos y TCRs.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una fracción de unión que se une al polipéptido de la invención cuando dicho péptido está en complejo con el MHC, en el que la fracción de unión es un receptor de células T (TCR) o un anticuerpo. La fracción de unión puede unirse parcialmente al MHC, siempre que también se una al péptido. La fracción

de unión puede unirse sólo al péptido, y esa unión puede ser específica. La fracción de unión puede unirse sólo al complejo péptido MHC y esa unión puede ser específica.

Cuando se utiliza con referencia a las fracciones de unión que se unen al complejo de la invención, "específico" se utiliza generalmente en el presente documento para referirse a la situación en la que la fracción de unión no muestra ninguna unión significativa a uno o más complejos polipeptídicos-MHC alternativos distintos del complejo polipeptídico-MHC de la invención. Los TCR que se unen a uno o más, y en particular a varios, antígenos presentados por células que no son la diana prevista del TCR, suponen un mayor riesgo de toxicidad cuando se administran *in vivo* debido a la potencial reactividad fuera del objetivo. Estos TCRs altamente reactivos no son adecuados para su uso terapéutico.

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

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

Los TCR heterodiméricos alfa-beta tienen una cadena alfa y una cadena beta. A grandes rasgos, cada cadena comprende una región variable, una región de unión y una región constante, y la cadena beta también suele contener una breve región de diversidad entre las regiones variable y de unión, pero esta región de diversidad suele considerarse parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDRs (Regiones Determinantes de la Complementariedad) hipervariables embebidas en una secuencia marco; se cree que la CDR3 es el principal mediador del reconocimiento del antígeno. Existen varios tipos de regiones variables de cadena alfa ($V\alpha$) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su marco, las secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida.

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

Además, los dominios TRAC/TRBC pueden contener modificaciones. Por ejemplo, la secuencia extracelular de la cadena alfa puede incluir una modificación relativa al TRAC de origen nativo/natural por la que el aminoácido T48 del TRAC, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C48. Asimismo, la secuencia extracelular de la cadena beta puede incluir una modificación relativa a la TRBC1 o TRBC2 de origen nativo/natural, por la que S57 de TRBC1 o TRBC2, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C57. Estas sustituciones de cisteína en relación con las secuencias extracelulares nativas de las cadenas alfa y beta permiten la formación de un enlace disulfuro no nativo entre cadenas que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado por el repliegue de las cadenas extracelulares alfa y beta (WO 03/020763). Este enlace disulfuro no nativo facilita el despliegue de los TCR correctamente plegados en los fagos. (Li et al., Nat Biotechnol 2005 Mar;23(3):349-54). Además, el uso del TCR soluble unido por disulfuro estable permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y de la semivida de unión. Las posiciones alternativas para la formación de un enlace disulfuro no nativo se describen en el documento WO 03/020763. Estos incluyen Thr 45 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 77 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Tyr 10 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 17 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; Thr 45 del exón 1 de TRAC*01 y Asp 59 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01; y Ser 15 del exón 1 de TRAC*01 y Glu 15 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01. Los TCR con un enlace disulfuro no nativo pueden ser de longitud completa o pueden estar truncados.

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

Los TCR de la invención pueden ser diseñados para incluir mutaciones. Los procedimientos para producir variantes mutadas del TCR de alta afinidad, tales como el despliegue de fagos y la mutagénesis dirigida al sitio, son conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase el documento WO 04/044004 y Li et al., Nat Biotechnol 2005 Mar;23(3):349-54). Preferentemente, las mutaciones para mejorar la afinidad se realizan dentro de las regiones variables de las cadenas alfa y/o beta. Más preferentemente, las mutaciones para mejorar la afinidad se realizan dentro de las CDR. Puede haber entre 1 y 15 mutaciones en las regiones variables de la cadena alfa y/o beta.

Los TCR de la invención también pueden ser marcados con un compuesto de generador de imagen, por ejemplo un marcador que es adecuado para fines de diagnóstico. Tales TCR marcados de alta afinidad son útiles en un procedimiento para detectar un ligando del TCR seleccionado entre los complejos CD1-antígeno, superantígenos bacterianos y complejos MHC-péptido/superantígeno, cuyo procedimiento comprende poner en contacto el ligando del TCR con un TCR de alta afinidad (o un complejo TCR multimérico de alta afinidad) que es específico para el ligando del TCR; y detectar la unión al ligando del TCR. En los complejos TCR multiméricos de alta afinidad, tales como los descritos en Zhu et al., J. Immunol. 2006 Mar 1;176(5):3223-32 (formado, por ejemplo, utilizando heterodímeros biotinilados) puede utilizarse estreptavidina fluorescente (disponible en el mercado) para proporcionar un marcador detectable. Un multímero marcado con fluorescencia es adecuado para su uso en el análisis FACS, por ejemplo para detectar las células presentadoras de antígeno que llevan el péptido para el que el TCR de alta afinidad es específico.

Un TCR de la presente invención (o un complejo multivalente del mismo) puede asociarse alternativa o adicionalmente con (por ejemplo, de forma covalente o enlazada de otro modo a) un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, una fracción tóxica para su uso en la eliminación de células, o un agente inmunoestimulante tal como una interleuquina o una citoquina. Un complejo TCR multivalente de alta afinidad de la presente invención puede tener una capacidad de unión potenciada para un ligando TCR en comparación con un heterodímero de receptor de células T no multimérico de tipo salvaje o de alta afinidad. Así, los complejos TCR multivalentes de alta afinidad según la invención son particularmente útiles para el seguimiento o el direccionamiento de células que presentan antígenos particulares *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermedios para la producción de otros complejos TCR multivalentes de alta afinidad que tienen tales usos. El TCR de alta afinidad o el complejo TCR multivalente de alta afinidad pueden, por tanto, proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para su uso *in vivo*.

Los TCR de alta afinidad de la invención pueden utilizarse en la producción de reactivos solubles biespecíficos. Un reactivo que comprende un TCR soluble, puede preferentemente fusionarse mediante un enlazador a un fragmento de anticuerpo específico anti-CD3. Detalles adicionales, incluyendo la forma de producir tales reactivos, se describen en el documento WO10/133828.

La invención también proporciona ácido nucleico que codifica el TCR de la invención, un vector de expresión del TCR que comprende ácido nucleico que codifica un TCR de la invención, así como una célula que alberga dicho vector. El TCR puede estar codificado en un único marco de lectura abierto o en dos marcos de lectura abiertos distintos. También se incluye en el ámbito de la invención una célula que alberga un primer vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica una cadena alfa de un TCR de la invención, y un segundo vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica una cadena beta de un TCR de la invención. Alternativamente, un vector puede codificar tanto una cadena alfa como una beta de un TCR de la invención.

La invención también proporciona una célula que muestra en su superficie un TCR de la invención. La célula puede ser una célula T u otra célula inmunitaria. La célula T puede ser modificada de forma que no se corresponda con una célula T tal y como existe en la naturaleza. Por ejemplo, la célula puede ser transfectada con un vector que codifica un TCR de la invención de manera que la célula T exprese un TCR adicional además del TCR nativo. Adicional o alternativamente, la célula T puede ser modificada de tal manera que no sea capaz de presentar el TCR nativo. Existen varios procedimientos adecuados para la transfección de células T con ADN o ARN que codifican los TCR de la invención (véase, por ejemplo Robbins et al., J. Immunol. 2008 Mayo 1;180(9):6116-31). Las células T que expresan los TCR de la invención son adecuadas para su uso en el tratamiento basado en la terapia adoptiva de enfermedades tales como el cáncer. Como sabrán los expertos en la técnica, existen varios procedimientos adecuados para llevar a cabo la terapia adoptiva (véase, por ejemplo Rosenberg et al., Nat Rev Cancer. 2008 Abr;8(4):299-308).

Los TCR de la invención destinados a ser utilizados en la terapia adoptiva están generalmente glicosilados cuando son expresados por las células T transfectadas. Como es bien sabido, el patrón de glicosilación de los TCR transfectados puede ser modificado por mutaciones del gen transfectado (Kuball J et al., J Exp Med. 2009 Feb 16;206(2):463-75).

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

La fracción de unión de la invención puede ser un anticuerpo. El término "anticuerpo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a las moléculas de inmunoglobulina y a las porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sea natural o producido parcial o totalmente de forma sintética. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulinas, ya sea natural o total o parcialmente sintético y cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o es homólogo, a un dominio de unión a anticuerpos. Por lo tanto, se incluyen las moléculas químicas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tiene las regiones variables de un anticuerpo no humano, por

ejemplo murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los procedimientos para fabricar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la patente U.S. No. 5225539. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; los fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y los diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede denominarse en el presente documento "mab".

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

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., *Nature*. 1989 Oct 12;341(6242):544-6) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., *Science*. 1988 Oct 21;242(4877):423-6 Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Ago;85(16):5879-83); (viii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión de genes (WO94/13804 P. Hollinger et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jul 15;90(14):6444-8). Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, cada uno de los cuales comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios enlazados (por ejemplo, por un enlazador peptídico) pero sin poder asociarse entre sí para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (WO94/13804). Cuando se utilicen anticuerpos biespecíficos, puede tratarse de anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diversas maneras (Hollinger & Winter, *Curr Opin Biotechnol*. 1993 Ago;4(4):446-9), por ejemplo, preparado químicamente o a partir de hibridomas, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Puede ser preferible utilizar dímeros de scFv o diacuerpos en lugar de anticuerpos enteros. Los diacuerpos y los scFv pueden construirse sin una región Fc, utilizando únicamente dominios variables, lo que reduce potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica. Otras formas de anticuerpos biespecíficos son los "Janusins" de cadena única descritos en Traunecker et al., *EMBO J*. 1991 Dic;10(12):3655-9). Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como los fragmentos de anticuerpos) con las especificidades de unión adecuadas pueden seleccionarse fácilmente utilizando el despliegue de fagos (WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si uno de los brazos del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces se puede hacer una biblioteca en la que se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad adecuada. Un "dominio de unión al antígeno" es la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a un antígeno y es complementaria a una parte o a la totalidad del mismo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte concreta del antígeno, cuya parte se denomina un epítipo. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables del anticuerpo. Un dominio de unión al antígeno puede comprender una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH).

La fracción de unión puede ser una molécula similar a un anticuerpo que ha sido diseñada para unirse específicamente a un complejo péptido-MHC de la invención. Son especialmente preferibles los anticuerpos que imitan el TCR, tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO2007143104 y Sergeeva et al., *Blood*. 2011 Abr 21;117(16):4262-72 y/o Dahan y Reiter. *Expert Rev Mol Med*. 2012 Feb 24;14:e6.

También se divulgan en el presente documento fracciones de unión basados en andamios proteicos diseñados. Los andamios proteicos se derivan de estructuras proteicas naturales estables y solubles que han sido modificadas para proporcionar un sitio de unión para una molécula diana de interés. Ejemplos de andamios proteicos diseñados incluyen, pero no se limitan a, los aficuerpos, que se basan en el dominio Z de la proteína A estafilocócica que proporciona una interfaz de unión en dos de sus hélices a (Nygren, *FEBS J*. 2008 Jun;275(11):2668-76); las anticalinas, derivadas de las lipocalinas, que incorporan sitios de unión para pequeños ligandos en el extremo abierto de un pliegue de barril beta (Skerra, *FEBS J*. 2008 Jun;275(11):2677-83), nanocuerpos y DARpins. Los andamios proteicos diseñados están típicamente direccionados a unir las mismas proteínas antigénicas que los anticuerpos, y son potenciales agentes terapéuticos. Pueden actuar como inhibidores o antagonistas, o como vehículos de suministro para direccionar moléculas, tales como toxinas, a un tejido específico *in vivo* (Gebauer y Skerra, *Curr Opin Chem Biol*. 2009 Jun;13(3):245-55). También se pueden utilizar péptidos cortos para unir una proteína diana. Los filómeros son péptidos naturales estructurados derivados de genomas bacterianos. Tales péptidos representan un conjunto diverso

de pliegues estructurales de proteínas y pueden utilizarse para inhibir/interrumpir las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Watt, Nat Biotechnol. 2006 Feb;24(2):177-83)].

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

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

Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del procedimiento deseado para administrarla a un paciente). Puede proporcionarse en forma de dosificación unitaria, generalmente se proporcionará en un envase sellado y puede ser proporcionado como parte de un kit. Normalmente (aunque no necesariamente) un kit de este tipo incluye instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitarias. Las composiciones y los procedimientos de administración adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, véase, Johnson et al., Blood. 2009 Jul 16;114(3):535-46 con referencia a los números de ensayo clínico NCI-07-C-0175 y NCI-07-C-0174. Las células de acuerdo con la invención se suministrarán usualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células T transfectadas con los TCR de la invención pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser una crema, emulsión, gel, liposoma, nanopartícula o ungüento.

La composición farmacéutica puede adaptarse para su administración por cualquier vía apropiada, tal como parenteral (incluida subcutánea, intramuscular o intravenosa), enteral (incluida oral o rectal), inhalatoria o intranasal. Tales composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, mezclando el ingrediente activo con el o los portadores o excipientes en condiciones estériles.

Las dosificaciones de las sustancias de la presente invención pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar (como el cáncer, la infección viral o la enfermedad autoinmune), la edad y el estado del individuo a tratar, etc. Por ejemplo, un rango de dosis adecuado para un reactivo que comprende un TCR soluble fusionado a un dominio anti CD3 puede estar entre 25 ng/kg y 50 µg/kg. Un médico determinará en última instancia las dosificaciones adecuadas que se deben utilizar.

El polipéptido de la invención puede proporcionarse en forma de una composición de vacuna. La composición de vacuna puede ser útil para el tratamiento o la prevención del cáncer. Todas estas composiciones están incluidas en la presente invención. Como se apreciará, las vacunas pueden adoptar varias formas (Schlom, J Natl Cancer Inst. 2012 Abr 18;104(8):599-613). Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede utilizarse directamente para inmunizar a los pacientes (Salgaller, Cancer Res. 1996 Oct 15;56(20):4749-57 y Marchand, Int J Cancer. 1999 Jan 18;80(2):219-30). La composición de vacuna puede incluir péptidos adicionales de manera que el polipéptido de la invención sea uno de una mezcla de péptidos. Se pueden añadir adyuvantes a la composición de vacuna para aumentar la respuesta inmunitaria.

Alternativamente, la composición de vacuna puede tomar la forma de una célula presentadora de antígeno que muestra el polipéptido de la invención en complejo con el MHC. Preferentemente la célula presentadora de antígeno es una célula inmune, más preferentemente una célula dendrítica. El péptido puede ser pulsado en la superficie de la célula (Thurner, J Exp Med. 1999 Dic 6;190(11):1669-78), o el ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención puede introducirse en las células dendríticas (por ejemplo, mediante electroporación. Van Tendeloo, Blood. 2001 Jul 1;98(1):49-56).

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

En un noveno aspecto, la invención proporciona un procedimiento de identificación de una fracción de unión que se une a un complejo de la invención, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una fracción de unión candidata con el complejo y determinar si la fracción de unión candidata se une al complejo. Los procedimientos para determinar la unión a los complejos polipéptidos-MHC son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos preferidos incluyen, pero no se limitan a, la resonancia de plasmón de superficie, o cualquier otra técnica de biosensores, ELISA, citometría de flujo, cromatografía, microscopía. Alternativamente, o además, la unión puede determinarse mediante ensayos funcionales en los que se detecta una respuesta biológica tras la unión, por ejemplo, la liberación de citoquinas o la apoptosis celular.

La fracción de unión candidata puede ser una fracción de unión del tipo ya descrito, tal como un TCR o un anticuerpo. Dicha fracción de unión puede obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las células T que se unen al antígeno y los TCR se han aislado tradicionalmente de sangre fresca obtenida de pacientes o donantes sanos. Dicho procedimiento involucra la estimulación de las células T utilizando DCs autólogas, seguidas de células B autólogas, pulsadas con el polipéptido de la invención. Pueden realizarse varias rondas de estimulación, por ejemplo tres o cuatro rondas. A continuación, las células T activadas pueden ser sometidas a pruebas de especificidad midiendo la liberación de citoquinas en presencia de células T2 pulsadas con el polipéptido de la invención (por ejemplo, utilizando un ensayo IFN γ ELISpot). A continuación, las células activadas pueden clasificarse mediante la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) utilizando anticuerpos marcados para detectar la producción intracelular de citoquinas (por ejemplo, IFN γ), o la expresión de un marcador de superficie celular (tal como CD137). Las células seleccionadas pueden expandirse y validarse adicionalmente, por ejemplo, mediante el ensayo ELISpot y/o la citotoxicidad contra las células diana y/o la tinción con el tetramero péptido-MHC. Las cadenas de TCR de los clones validados pueden entonces ser amplificadas por medio de la amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) y secuenciadas.

Alternativamente, los TCR y los anticuerpos pueden obtenerse a partir de bibliotecas de visualización en las que el complejo péptido MHC de la invención se utiliza para barrer la biblioteca. La producción de bibliotecas de anticuerpos mediante el despliegue de fagos es bien conocida en la técnica, por ejemplo, véase Aitken, Antibody phage display: Methods and Protocols (2009, Humana, Nueva York). Los TCR pueden desplegarse en la superficie de partículas de fago y partículas de levadura, por ejemplo, y tales bibliotecas se han utilizado para el aislamiento de variantes de alta afinidad del TCR derivadas de clones de células T (como se describe en WO04044004 y Li et al. Nat Biotechnol. 2005 Mar;23(3):349-54 y WO9936569). Más recientemente se ha demostrado que las bibliotecas de fagos de TCR pueden utilizarse para aislar TCR con una novedosa especificidad de antígeno. Estas bibliotecas se construyen típicamente con secuencias de cadenas alfa y beta que corresponden a las que se encuentran en un repertorio natural. Sin embargo, la combinación aleatoria de estas secuencias de cadenas alfa y beta, que se produce durante la creación de la biblioteca, produce un repertorio de TCRs que no está presente en la naturaleza (como se describe en WO2015/136072, WO2017046198, WO2017046201, WO/2017/046202, WO/2017/046205, WO/2017/046207, WO/2017/046208, WO/2017/04621 tierra WO/2017/046212)

El complejo polipeptídico-MHC de la invención puede utilizarse preferentemente para cribar una biblioteca de diversos TCR desplegados en la superficie de partículas de fago. Los TCR desplegados por dicha biblioteca pueden no corresponder a los contenidos en un repertorio natural, por ejemplo, pueden contener emparejamientos de cadenas alfa y beta que no estarían presentes *in vivo*, y o los TCR pueden contener mutaciones no naturales y o los TCR pueden estar en forma soluble. El cribado puede implicar el barrido de la biblioteca de fagos con complejos péptido-MHC de la invención y el posterior aislamiento de los fagos unidos. Para ello, los complejos péptido-MHC pueden fijarse a un soporte sólido, tal como una perla magnética, o a una matriz de columna y complejos péptido-MHC unidos a fagos aislados, con un imán o por cromatografía, respectivamente. Los pasos de barrido pueden repetirse varias veces, por ejemplo, tres o cuatro veces. Los fagos aislados pueden seguir expandiéndose en células de E. coli. Las partículas de fago aisladas pueden probarse para la unión específica de los complejos péptido-MHC de la invención. La unión puede detectarse mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, ELISA o SPR, por ejemplo, utilizando un instrumento BiaCore. La secuencia de ADN del receptor de células T desplegada por el fago de unión al péptido-MHC puede identificarse además mediante procedimientos estándar de PCR.

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

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes Ejemplos y Figuras, que se dan sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención en modo alguno.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 5 muestran los respectivos espectros de fragmentación de los péptidos de SEQ ID NOS: 1 a 5, eludido de las células. Una tabla que destaca los iones coincidentes se muestra debajo de cada espectro.

La Figura 6 muestra placas de ELISA que demuestran la especificidad de los TCR para un complejo del péptido de la SEQ ID NO: 5 y HLA-A*02, comparando la unión con otros complejos péptido-HLA-A*02.

La figura 7 muestra las secuencias de aminoácidos de las respectivas cadenas variables alfa y beta de los TCR de la figura 6.

Ejemplos

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

La presentación de los péptidos restringidos por HLA derivados de MAGEB2 en la superficie de las líneas celulares tumorales se investigó utilizando espectrometría de masas.

Procedimiento

Las líneas celulares inmortalizadas obtenidas de fuentes comerciales se mantuvieron y expandieron bajo condiciones estándar.

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

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

Los péptidos se analizaron mediante nanoLCMS/MS utilizando un nanoLC Dionex Ultimate 3000 acoplado bien sea a espectrómetros de masas AB Sciex Triple TOF 5600 o Thermo Orbitrap Fusion. Ambas máquinas estaban equipadas con fuentes de iones de nanoelectroaspersión. Los péptidos se cargaron en una columna trampa Acclaim PepMap 100 (Dionex) y se separaron utilizando una columna Acclaim PepMap RSLC (Dionex). Los péptidos se cargaron en la fase móvil A (ácido fórmico al 0,5%: agua) y se eluyeron utilizando un gradiente de tampón B (acetonitrilo:ácido fórmico al 0,5%) directamente en la fuente de ionización de nanoelectroaspersión.

Para la identificación de péptidos, el espectrómetro de masas fue operado utilizando un flujo de trabajo de adquisición dependiente de la información (IDA). La información adquirida en estos experimentos se utilizó para buscar en la base de datos Uniprot de proteínas humanas, péptidos consistentes con los patrones de fragmentación observados, utilizando el software Protein pilot (Ab Sciex) y el software PEAKS (Bioinformatics solutions). El software asigna una puntuación a los péptidos identificados, basándose en la coincidencia entre los patrones de fragmentación observados y los esperados.

Resultados

Los polipéptidos establecidos en la tabla 1, correspondientes a las SEQ ID NOS: 1-5, fueron detectados por espectrometría de masas tras su extracción de líneas celulares de cáncer. En la tabla se indica un ejemplo de línea celular en la que se detectó el péptido junto con el anticuerpo HLA utilizado para la purificación por inmunoafinidad.

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Anticuerpo HLA	Ejemplo de línea celular de cáncer
1	EEIWEFLNML	clase I	U266
2	SVFGEPWKLITK	clase I	U266
3	REHFPEILKKA	clase I	U266
4	SVFGEPWKL	HLA-A*02	HCT116
5	KVLEFLAKV	HLA-A*02	U266

Las figuras 1-5 muestran patrones de fragmentación representativos para los péptidos de SEQ ID NOS: 1-5 respectivamente. Una tabla que destaca los iones coincidentes se muestra debajo de cada espectro.

Ejemplo 2 - Preparación de complejos péptido-HLA recombinantes

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

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

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

La mezcla replugada se dializó entonces contra 20 L de agua desionizada a 4°C durante 16 h, seguida de 10 mM de Tris pH 8.1 durante otras 16 h. La solución proteica se filtró entonces a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS HQ (8 ml de volumen de lecho) equilibrada con 20 mM de Tris pH 8.1. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl utilizando un purificador AKTA (GE Healthcare). El complejo HLA-péptido eluyó a aproximadamente 250 mM de NaCl, y se recogieron las fracciones máximas, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Las moléculas de pHLA etiquetadas por biotilación se intercambiaron en tampón en 10 mM Tris pH 8.1, 5 mM NaCl utilizando una columna de desalinización rápida de GE Healthcare equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteínas se enfriaron en hielo y se añadió un cóctel de inhibidores de la proteasa (Calbiochem). A continuación se añadieron los reactivos de biotilación: 1 mM de biotina, 5 mM de ATP (tamponado a pH 8), 7,5 mM de $MgCl_2$ y 5 $\mu g/ml$ de enzima BirA (purificada según O'Callaghan et al., (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). A continuación, se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche.

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

Tales complejos péptido-MHC pueden utilizarse en forma soluble o pueden ser inmovilizados a través de su fracción de biotina terminal C en un soporte sólido, para ser utilizados para la detección de células T y receptores de células T que se unen a dicho complejo. Por ejemplo, estos complejos pueden utilizarse en el barrido de bibliotecas de fagos, en la realización de ensayos ELISA y en la preparación de chips sensores para mediciones Biacore.

Ejemplo 3 - identificación de TCRs que se unen a un complejo péptido-MHC de la invención

Procedimiento

Se obtuvieron TCRs de unión a antígeno utilizando péptidos de la invención para barrer una biblioteca de fagos de TCR. La biblioteca se construyó utilizando secuencias de cadenas alfa y beta obtenidas de un repertorio natural (como se describe en WO2015/136072, WO2017046198, WO2017046201, WO/2017/046202, WO/2017/046205, WO/2017/046207, WO/2017/046208, WO/2017/04621 tierra WO/2017/046212). La combinación aleatoria de estas secuencias de cadenas alfa y beta, que se produce durante la creación de la biblioteca, produce un repertorio no natural de combinaciones de cadenas alfa beta.

Los TCR obtenidos de la biblioteca fueron evaluados por ELISA para confirmar el reconocimiento específico del antígeno. Los ensayos ELISA se realizaron como se describe en el documento WO2015/136072. En resumen, las placas MaxiSorp ELISA de 96 pocillos se recubrieron con estreptavidina y se incubaron con el complejo péptido-HLA biotinilado de la invención. Se añadieron clones de fagos que portaban TCR a cada pocillo y se llevó a cabo la detección utilizando un conjugado de anticuerpos anti-M13-HRP. El anticuerpo unido se detectó utilizando el sistema de sustrato de peroxidasa TMB Microwell de KPL labs. La aparición de un color azul en el pocillo indicaba la unión del TCR al antígeno. Una ausencia de unión a complejos alternativos péptido-HLA indicó que el TCR no es altamente reactivo de forma cruzada.

La confirmación adicional de que los TCR son capaces de unirse a un complejo que comprende un complejo péptido HLA de la invención puede obtenerse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando TCRs aislados. En este caso las secuencias de las cadenas alfa y beta se expresan en *E. coli* como TCRs solubles, (WO2003020763 Boulter, et al., Protein Eng, 2003. 16: 707-711). La unión de los TCR solubles a los complejos se analiza mediante resonancia de plasmón de superficie utilizando un instrumento BiaCore 3000. Los monómeros de péptidos-HLA biotinilados se preparan como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2) y se inmovilizan en un chip sensor CM-5 acoplado a estreptavidina. Todas las mediciones se realizan a 25°C en tampón PBS suplementado con 0,005% de Tween a un caudal constante. Para medir la afinidad, se hacen fluir diluciones en serie de los TCR solubles sobre los péptidos-MHCs inmovilizados y se determinan los valores de respuesta en equilibrio para cada concentración. Los datos se analizan trazando la unión específica de equilibrio frente a la concentración de la proteína, seguida de un ajuste por mínimos cuadrados a la ecuación de unión de Langmuir, asumiendo una interacción 1:1.

Resultados

Los TCR que reconocen específicamente los complejos péptido-HLA de la invención se obtuvieron de la biblioteca. La figura 6 muestra los datos de ELISA para tres de estos TCRs.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del TCR alfa y beta de los TCR identificados en la Figura 6 se proporcionan en la Figura 7.

Estos datos confirman que los TCR específicos de antígeno pueden ser aislados.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en el que el polipéptido forma un complejo con una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).
2. Un complejo del polipéptido de la reivindicación 1 y una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).
- 5 3. El complejo de la reivindicación 2, en el que la molécula MHC es MHC clase I.
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido definido en la reivindicación 1.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4.
6. Una célula que comprende un vector como el que se reivindica en la reivindicación 5.
- 10 7. Una fracción de unión que se une al polipéptido de la reivindicación 1 cuando está en complejo con el MHC, en la que la fracción de unión es un receptor de células T (TCR) o un anticuerpo.
8. La fracción de unión de la reivindicación 7, en la que el TCR está en la superficie de una célula.
9. Un polipéptido como se define en la reivindicación 1, un complejo como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4, un vector como se define en la reivindicación 5, una célula como se define en la reivindicación 6 o una fracción de unión como se define en la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para su uso en medicina.
- 15 10. El polipéptido, complejo, ácido nucleico, vector, célula o fracción de unión para su uso definido en la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.
11. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la reivindicación 1, un complejo como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4, un vector como se define en la reivindicación 5, una célula como se define en la reivindicación 6 o una fracción de unión como se define en la reivindicación 7 o la reivindicación 8, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 12. Un procedimiento para identificar una fracción de unión que se une a un complejo como se reivindica en la reivindicación 2 o en la reivindicación 3, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una fracción de unión candidata con el complejo y determinar si la fracción de unión candidata se une al complejo.
- 25

Figura 1

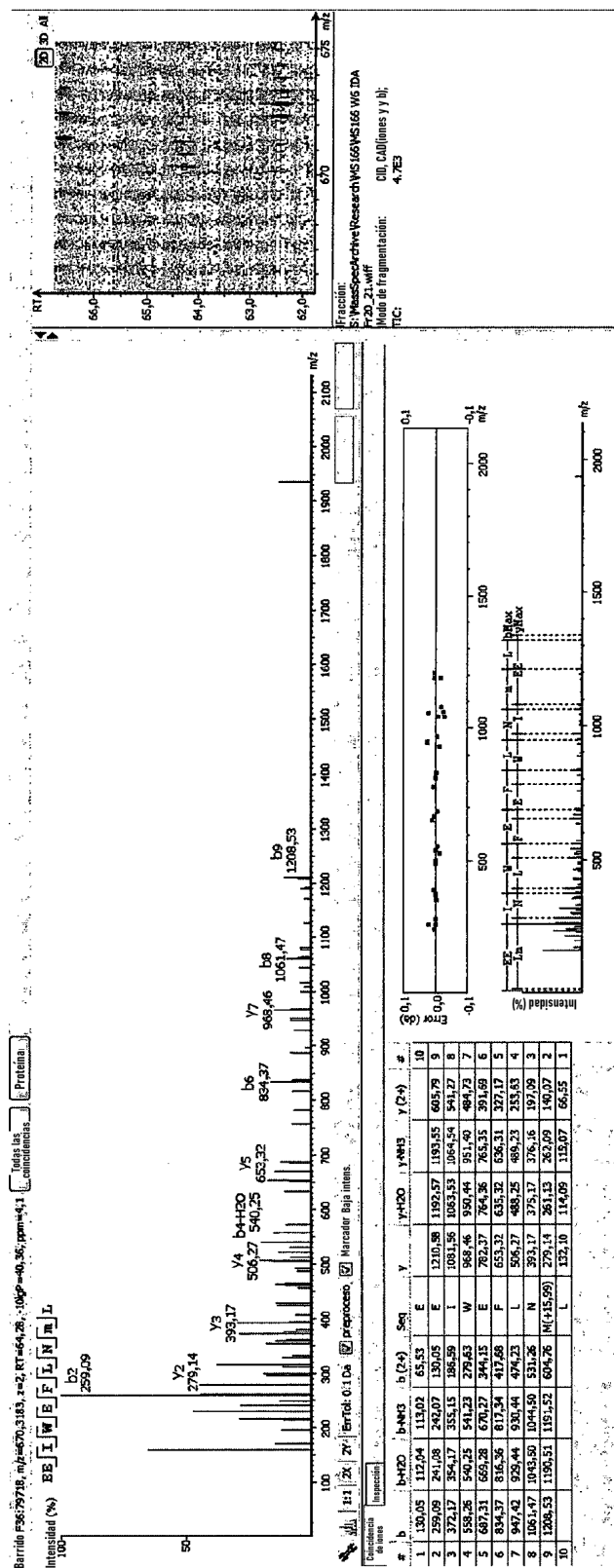


Figura 2

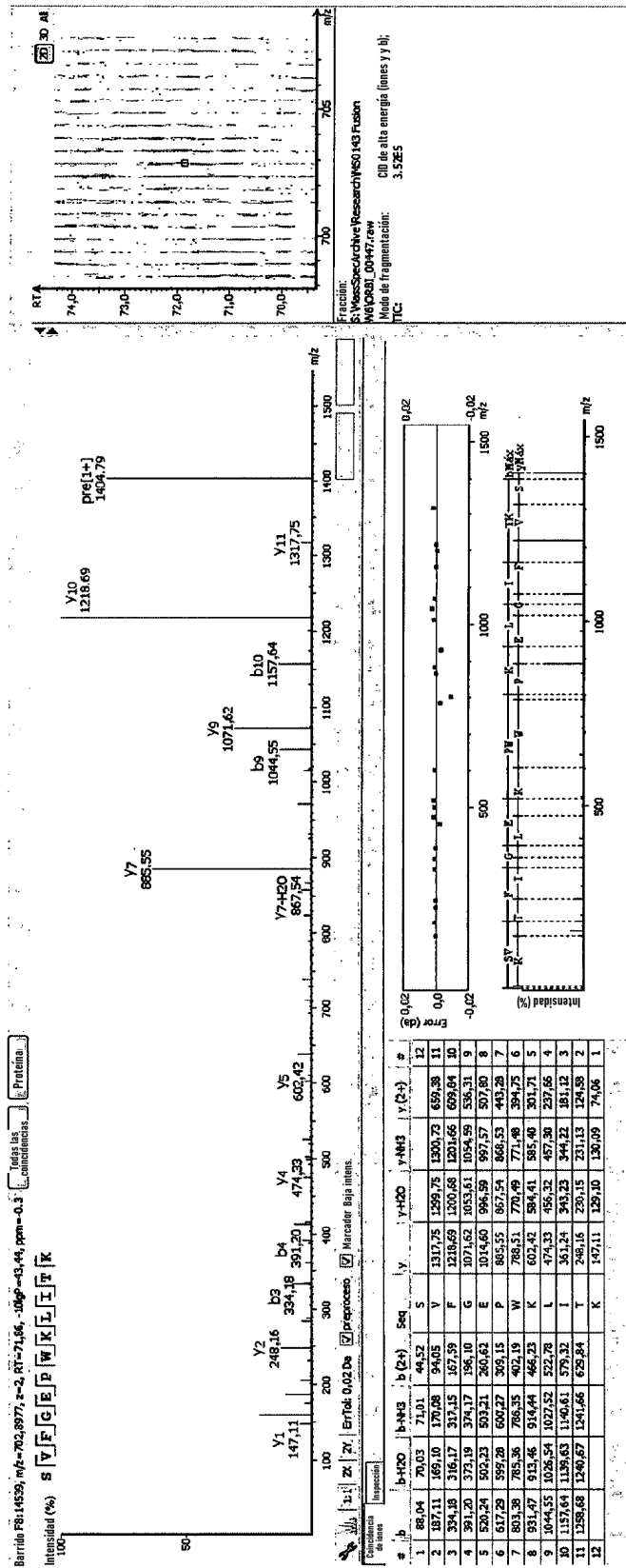








Figura 6

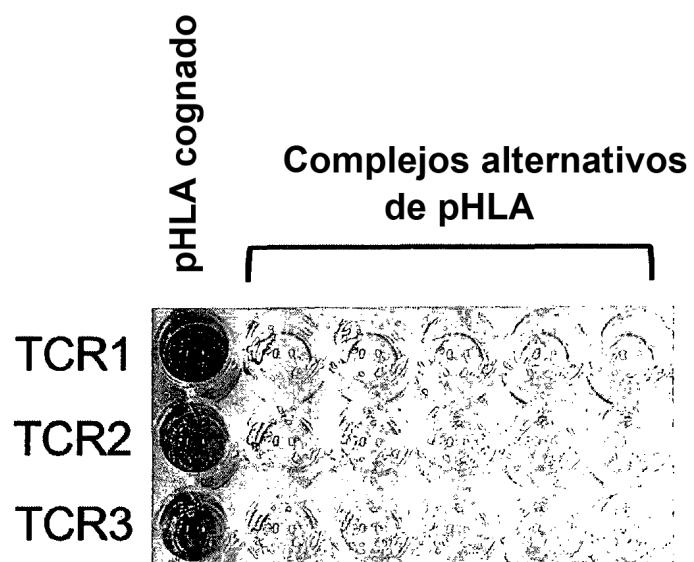


Figura 7

MAGEB2 - KVLEFLAKV

TCR1

Región variable de cadena alfa

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

Región variable de cadena beta

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

TCR2

Región variable de cadena alfa

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

Región variable de cadena beta

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

TCR3

Región variable de cadena alfa

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

Región variable de cadena beta

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