

RECEPTORES DE CÉLULAS T

La presente invención se refiere a receptores de células T (TCR) que se unen al péptido restringido a HLA-A*02 GVIDGREHTV (SEQ ID NO: 1) procedente del antígeno de cáncer de línea germinal MAGE A4. Dichos TCR pueden comprender mutaciones no naturales dentro de los dominios variables alfa y/o beta con respecto a un TCR de MAGE A4 nativo. Los TCR de la invención son particularmente adecuados para uso como nuevos reactivos inmunoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades malignas.

Antecedentes de la invención

Los receptores de células T (TCR) se expresan de forma natural por células T CD4⁺ y CD8⁺. Los TCR están diseñados para reconocer antígenos peptídicos cortos que se presentan en la superficie de células presentadoras de antígeno junto con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (en seres humanos, las moléculas del MHC también se conocen como Antígenos Leucocitarios Humanos o HLA) (Davis, et al., (1998), Annu Rev Immunol 16: 523-544.). Las células T CD8⁺, que también reciben el nombre de linfocitos T citotóxicos, reconocen específicamente péptidos unidos al MHC de clase I y generalmente son responsables del hallazgo y la mediación de la destrucción de células enfermas. Las células T CD8⁺ son capaces de destruir células cancerosas así como células infectadas por virus; sin embargo, la afinidad de TCR expresadas por células T específicas de cáncer en el repertorio natural típicamente es baja como resultado de la selección tímica, lo que significa que las células cancerosas a menudo escapan de la detección y la destrucción. Nuevos enfoques inmunoterapéuticos destinados a promover el reconocimiento de cánceres por células T ofrecen una estrategia muy prometedora para el desarrollo de tratamientos anticancerosos eficaces.

MAGE A4 pertenece a la familia MAGE de antígenos de cáncer codificados por la línea germinal (De Plaen, et al., (1994), Immunogenetics 40(5): 360-369) y tiene el número de acceso de Uniprot P43358. Se ha descubierto que estos antígenos se expresan con frecuencia en una diversidad de cánceres, aunque su expresión

en tejidos normales está limitada a testículos de adultos y otros sitios inmunoprivilegiados entre los que se incluye la placenta.

La naturaleza cancerosa específica de estos genes hace que sean dianas ideales para agentes terapéuticos anticancerosos. Sigue sin conocerse la función precisa de MAGE A4, pero se cree que interviene en el desarrollo embrionario. Se ha notificado un alto nivel de expresión de MAGE A4 en tumores de varios tipos entre los que se incluye el melanoma, carcinomas del esófago, la cabeza y el cuello, el pulmón, la mama y la vejiga (Bergeron, (2009), *Int J Cancer* 125(6): 1365-1371; Cabezon, et al., (2013), *Mol Cell Proteomics* 12(2): 381-394; Cuffel, et al., (2011), *Int J Cancer* 128(11): 2625-2634; Forghanifard, et al., (2011), *Cancer Biol Ther* 12(3): 191-197; Karimi, et al., (2012), *Clin Lung Cancer* 13(3): 214-219; Svobodova, et al., (2011), *Eur J Cancer* 47(3): 460-469). El péptido decaamérico GVDGREHTV (SEQ ID NO 1) corresponde a los aminoácidos 230-239 de la proteína MAGE A4 de longitud completa. Este péptido se une a HLA-A*02 y se ha demostrado que el complejo péptido-HLA estimula a los linfocitos T citotóxicos ocasionando la lisis de células tumorales positivas para MAGE A4 y positivas para HLA-A*02 (Duffour, et al., (1999), *Eur J Immunol* 29(10): 3329-3337 y documento WO2000020445). Por lo tanto, el complejo GVDGREHTV HLA-A*02 proporciona un antígeno diana útil para la intervención inmunoterapéutica.

La identificación de secuencias particulares de TCR que se unen al complejo GVDGREHTV HLA-A*02 con alta especificidad es ventajosa para el desarrollo de nuevas inmunoterapias. Los TCR terapéuticos pueden usarse, por ejemplo, como agentes de direccionamiento solubles con el fin de liberar agentes efectores inmunológicos o citotóxicos contra el tumor (Lissin, et al., (2013). "High-Affinity Monoclonal T-cell receptor (mTCR) Fusions. Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges". S. R. Schmidt, Wiley; Boulter, et al., (2003), *Protein Eng* 16(9): 707-711; Liddy, et al., (2012), *Nat Med* 8: 980-987) o, como alternativa, pueden usarse para obtener células T mediante ingeniería genética para una terapia adoptiva (June, et al., (2014), *Cancer Immunol Immunother* 63(9): 969-975). Sin embargo, en la técnica no se conoce ninguna de estas secuencias de

TCR y los métodos para la identificación de TCR con características de especificidad con posibilidad de uso terapéutico tienen una alta tasa de abandono y, por lo tanto, no proporcionan al experto en la materia una expectativa de éxito razonable.

En primer lugar, el experto en la materia necesita identificar una secuencia de partida o de armazón adecuada. Típicamente, estas secuencias se obtienen a partir de fuentes naturales, por ejemplo, a partir de células T que responden a antígenos extraídas de la sangre del donante. Dada la singularidad de las células T específicas de cáncer en el repertorio natural, a menudo es necesario explorar muchos donantes, por ejemplo 20 o más, antes de poder encontrar una célula T que responda. El proceso de exploración puede durar varias semanas o meses e, incluso cuando se encuentra una célula T que responde, puede ser inadecuada para uso inmunoterapéutico. Por ejemplo, la respuesta puede ser demasiado débil y/o puede no ser específica para el antígeno diana, como alternativa, es posible que no pueda generarse una población de células T clonales, ni expandir o mantener una línea de células T dada para producir suficiente material para identificar las secuencias correctas de la cadena de TCR. Además, como las TCR son degeneradas y se ha predicho que pueden unirse aproximadamente a un millón de péptidos del HLA diferentes (Wooldridge, et al., (2012), J Biol Chem 287(2): 1168-1177)) es excepcionalmente difícil incluso para los expertos en la materia poder determinar si un TCR particular tiene un perfil específico que lo haga elegible para el proceso de ingeniería para uso terapéutico.

Las secuencias de TCR que son adecuadas como secuencias de partida o de armazón deben tener una buena afinidad por el complejo de péptido diana-HLA, por ejemplo de 200 μ M o mayor, demostrar un alto nivel de especificidad por la diana, por ejemplo, una unión relativamente débil o nula a complejos de péptido-HLA alternativos, poder utilizarse en bibliotecas de presentación, tales como de presentación en fagos, y poder replegarse y purificarse con un alto rendimiento.

Los TCR, según existen en la naturaleza, tienen una afinidad débil por el antígeno diana (bajo intervalo micromolar) en comparación con los anticuerpos, y los TCR contra antígenos cancerosos típicamente tienen un reconocimiento de antígeno más débil que los TCR específicos de virus (Aleksic, et al. (2012). *Eu J Immunol.*, 42(12), 3174-3179). Esta débil afinidad, junto con la regulación negativa de HLA en las células cancerosas, significa que los TCR terapéuticos para la inmunoterapia del cáncer requieren ingeniería genética para aumentar su afinidad por el antígeno diana y así generar una respuesta más potente. Son deseables afinidades de unión a antígeno de TCR en el intervalo nanomolar a picomolar, con semividas de unión de varias horas, para agentes de direccionamiento solubles basados en TCR. La potencia mejorada generada por reconocimiento de antígenos de alta afinidad a bajas cantidades de epítomos se ejemplifica en las Figuras 1e y 1f de Liddy et al. (Liddy, et al. (2012), *Nat Med*, 18(6), 980-987). La maduración de afinidad típicamente implica que el experto en la materia tiene que identificar mutaciones específicas y/o combinaciones de mutaciones, entre las que se incluyen, pero sin limitación, sustituciones, inserciones y/o deleciones, que pueden realizarse en la secuencia de TCR de partida para aumentar la fuerza de reconocimiento de antígeno. En la técnica se conocen métodos para identificar mutaciones de un TCR dado confieren un aumento de afinidad, por ejemplo, el uso de bibliotecas de presentación (Li et al., (2005) *Nat Biotechnol.* 23(3):349-354; Holler et al., (2000). *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(10):5387-5392). Sin embargo, para producir aumentos significativos en la afinidad de un TCR dado contra una diana dada, el experto en la materia necesita seleccionar mutaciones específicas y/o combinaciones de mutaciones de un gran conjunto de alternativas posibles. Las mutaciones específicas y/o combinaciones de mutaciones que producen aumentos significativos de afinidad no son predecibles y hay una alta tasa de abandono. En muchos casos no es posible conseguir aumentos significativos de afinidad con una secuencia de partida de TCR dada.

Los proceso de maduración de afinidad también debe tener en cuenta la necesidad de mantener la especificidad del antígeno de

TCR. El aumento de la afinidad de un TCR por su antígeno diana lleva asociado un riesgo sustancial de manifestar reactividad cruzada con otras dianas indeseadas como resultado de la degeneración intrínseca del reconocimiento de antígenos de TCR (Wooldridge, et al., (2012), J Biol Chem 287(2): 1168-1177; Wilson, et al., (2004), Mol Immunol 40(14-15): 1047-1055; Zhao et al., (2007) J. Immunol, 179;9, 5845-5854). A un nivel natural de afinidad, el reconocimiento del antígeno de reacción cruzada puede ser demasiado bajo para producir una respuesta. Si se presenta un antígeno con reacción cruzada en células sanas normales, existe una gran posibilidad de unión fuera de la diana *in vivo*, que puede manifestarse como toxicidad clínica. Por lo tanto, además de aumentar la fuerza de unión al antígeno, el experto en la materia también debe seleccionar mutaciones y/o combinaciones de mutaciones que permitan al TCR retener una alta especificidad por el antígeno diana y demostrar un buen perfil de seguridad en el ensayo preclínico. De nuevo, estas mutaciones y/o combinaciones de mutaciones no son predecibles. La tasa de abandono en esta fase es incluso mayor y, en muchos casos, no puede conseguirse en absoluto a partir de una secuencia de partida de TCR dada.

Las mutaciones requeridas para la alta afinidad y alta especificidad también deben producir un TCR que pueda expresarse, replegarse y purificarse a un rendimiento razonable y que sea altamente estable en una forma purificada.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente para identificar secuencias de TCR con características adecuadas para uso terapéutico, los inventores han descubierto sorprendentemente una secuencia de TCR que proporciona un punto de partida ideal, o armazón, para producir TCR terapéuticos. Además, los inventores han identificado inesperadamente mutaciones adecuadas que pueden introducirse en los dominios variables alfa y beta del armazón para producir secuencias de TCR con características ideales para la inmunoterapia dirigida basada en TCR de cánceres que expresan MAGE A4.

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor de células T (TCR) que tiene la propiedad de unirse a

GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) junto con HLA-A*02 y que comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR y/o un dominio variable de cadena beta de TCR,

el dominio variable de cadena alfa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90 % con la secuencia de los residuos de aminoácido 1-113 de la SEQ ID NO: 2, y/o

el dominio variable de cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90 % con la secuencia de los residuos de aminoácido 1-116 de la SEQ ID NO: 3,

El dominio variable de cadena alfa puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 2, y/o el dominio variable de cadena beta puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con los aminoácidos 1-116 de la SEQ ID NO: 3.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un TCR que se une a un complejo GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 con una afinidad mayor de 200 μ M, en donde: las CDR 1, 2 y 3 de la cadena alfa comprenden las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, y/o las CDR 1, 2 y 3 de la cadena beta comprenden las SEQ ID NO 11, 12 y 13, respectivamente; y/o al menos una de las CDR contiene una o más sustituciones conservativas con respecto a las SEQ ID NO: 6 a 8 y 11 a 13; y/o al menos una de las CDR contiene hasta tres sustituciones toleradas con respecto a las SEQ ID NO: 6 a 8 y 11 a 13.

La afinidad de los TCR de la invención por el complejo GVDGREHTV HLA-A*02 puede estar en el intervalo de 200 μ M a 1 pM. Preferentemente, dichas sustituciones no cambian la afinidad de unión más del $\pm$ 50 % o, más preferentemente, no más del $\pm$ 20 %, con respecto al TCR no sustituido. Preferentemente, dichas sustituciones no aumentan la afinidad de unión por complejos de péptido alternativo-HLA.

El TCR de armazón tiene el siguiente uso de cadena variable alfa y beta:

Cadena alfa: TRAV10*01/TRAJ6*01

Cadena beta: TRBV28*01/TRBD1*01/TRBJ2-7*01/

(Nota, el término '*01' indica la variante alélica para esta secuencia, según se indica por la nomenclatura IMGT)

y las siguientes secuencias de CDR3 de cadena alfa y beta:

Cadena alfa: VVNHSGGSYIPTF (SEQ ID NO: 8)

Cadena beta: ASSFLMTSGDPYEQYF (SEQ ID NO: 13)

Las expresiones 'TCR de armazón' o 'TCR de partida' se usan como sinónimos, en la presente solicitud, de las expresiones 'TCR de tipo silvestre' o 'TCR WT' o 'TCR no mutado' o 'TCR nativo' o 'TCR parental' para hacer referencia a un TCR que tiene un dominio variable de cadena alfa que comprende los residuos 1-113 de la SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena beta que comprende los residuos 1-116 de la SEQ ID NO: 3. El dominio constante del TCR WT puede ser de longitud completa o puede estar truncado y/o mutado para producir un TCR soluble. En cualquier caso, pueden introducirse sustituciones por cisteína en las regiones TRAC y TRBC de tal manera que pueda formarse un puente disulfuro intercatenario no nativo. En el documento W003020763 se describen posiciones adecuadas para la localización de dichas sustituciones de cisteína. La figura 2 de los dibujos adjuntos muestra las secuencias extracelulares de las cadenas alfa y beta del TCR de tipo silvestre, respectivamente, en formato soluble. La SEQ ID NO: 4 es idéntica a la secuencia extracelular de la cadena alfa nativa SEQ ID NO: 2 con la excepción de que la cisteína en la posición 48 del dominio constante se ha reemplazado por treonina. Análogamente, la SEQ ID NO: 5 es idéntica a la secuencia extracelular de la cadena beta nativa SEQ ID NO: 3 con la excepción de que la cisteína en la posición 57 del dominio constante se ha reemplazado por treonina, la cisteína en la posición 75 del dominio constante se ha reemplazado por alanina y la asparagina en la posición 89 del dominio constante se ha reemplazado por ácido aspártico. El TCR de tipo silvestre soluble puede usarse para proporcionar una referencia con la cual puede compararse el perfil de unión de los TCR mutados de la invención.

Las secuencias de TCR definidas en el presente documento se describen con referencia a la nomenclatura IMGT que es muy

conocida y accesible para los que trabajan en el campo de los TCR. Por ejemplo, véase: LeFranc y LeFranc, (2001). "T cell Receptor Factsbook", Academic Press; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc 2011(6): 595-603; Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 100; y Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266. En resumen, Los TCR $\alpha\beta$ consisten en dos cadenas unidas por disulfuro. Generalmente se considera que cada cadena (alfa y beta) tiene dos dominios, concretamente un dominio variable y un dominio constante. Una región de unión corta conecta los dominios variable y constante y típicamente se considera parte de la región variable alfa. Además, la cadena beta normalmente contiene una región de diversidad corta próxima a la región de unión, que también se considera típicamente parte de la región variable beta.

El dominio variable de cada cadena está localizado en el extremo N y comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) integradas en una secuencia marco. Las CDR comprenden el sitio de reconocimiento para la unión del péptido-MHC. Hay varios genes que codifican las regiones variables de cadena alfa ($V\alpha$) y varios genes que codifican las regiones variables de cadena beta ($V\beta$), que se distinguen por sus secuencias de la región marco, de CDR1 y de CDR2, y por una secuencia de CDR3 definida parcialmente. En la nomenclatura IMGT, se hace referencia a los genes de $V\alpha$ y $V\beta$ por el prefijo TRAV y TRBV respectivamente (Folch y Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner y Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc y LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). Análogamente, hay varios genes de unión o J, denominados TRAJ o TRBJ, para la cadena alfa y beta, respectivamente, y para la cadena beta, un gen de diversidad o D denominado TRBD (Folch y Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 107-114; Scaviner y Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 97-106; LeFranc y LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). La enorme diversidad de las cadenas de los receptores de células T se debe a reordenamientos combinatorios entre los diversos genes de V, J y D, que incluyen variantes alélicas y diversidad en las regiones de unión (Arstila, et al., (1999), Science 286(5441): 958-961; Robins et al., (2009),

Blood 114(19): 4099-4107). Las regiones constantes, o C, de las cadenas alfa y beta de los TCR se denominan TRAC y TRBC respectivamente (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10).

El dominio variable de cadena alfa del primer o el segundo aspecto puede tener una mutación en al menos una de las siguientes posiciones respecto a la numeración de los residuos 1 -113 de la SEQ ID NO: 2: M50, T51, F52, S53, E54, H94, S95, G96, S98. Las mutaciones pueden seleccionarse entre los siguientes aminoácidos respecto a la numeración de los residuos 1-113 de la SEQ ID NO: 2:

Residuo n.º	
M50	L
T51	D
F52	Y
S53	A
E54	I
H94	S, R
S95	A
G96	N, D, S, Q
Residuo n.º	
S98	L

(Tabla 1)

Además o como alternativa, el dominio variable de cadena beta del primer o el segundo aspecto puede tener una mutación en al menos una de las siguientes posiciones respecto a la numeración de los residuos 1 -116 de la SEQ ID NO: 3: M27; D28; H29, E30, N31, Y50, D51, V52, K53, M54, F95, L96, M97, T98. Las mutaciones pueden seleccionarse entre los siguientes aminoácidos respecto a la numeración de los residuos 1-116 de la SEQ ID NO: 3:

Residuo n.º	
M27	A, L
D28	P
H29	L
E30	S
N31	K
Y50	R
D51	F

Residuo n.º	
V52	A
K53	T
M54	G, L
F95	S
L96	D
M97	Q
T98	N

(Tabla 2)

El dominio variable de cadena alfa puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de las mutaciones mostradas en la Tabla 1 y/o el dominio variable de cadena beta puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de las mutaciones mostradas en la Tabla 2

El dominio variable de cadena alfa puede tener al menos uno de los siguientes grupos de mutaciones:

Grupo 1: M50L, T51D, F52Y, S53A, E54I

Grupo 2: H94S, S95A, G96N, S98L

Grupo 3: H94R S95A, G96D, S98L

Grupo 4: M50L, T51D, F52Y, S53A, E54I, H94R S95A, G96D, S98L

Grupo 5: M50L, H94S, S95A, G96S, S98L

Grupo 6: M50L, H94S, S95A, G96Q, S98L

y/o el dominio variable de cadena beta puede tener al menos uno de los siguientes grupos de mutaciones:

Grupo 1: M27A, D28P, H29L, E30S, N31K F95S, L96D, M97Q, T98N

Grupo 2: Y50R, D51F, V52A, K53T, M54G, F95S, L96D, M97Q, T98N

Grupo 3: F95S, L96D, M97Q, T98N

Grupo 4: M27L, Y50R, D51F, V52A, K53T, M54G, F95S, L96D, M97Q, T98N

Grupo 5: M27A, D28P, H29L, E30S, N31K, M54L, F95S, L96D, M97Q, T98N

Por ejemplo, el dominio variable de cadena alfa puede tener mutaciones del Grupo 4 y el dominio variable de cadena beta puede tener mutaciones del Grupo 1; el dominio variable de cadena alfa puede tener mutaciones del Grupo 4 y el dominio variable de cadena beta puede tener mutaciones del Grupo 5; el dominio variable de cadena alfa puede tener mutaciones del Grupo 2 y el dominio variable de cadena beta puede tener mutaciones del Grupo 2; el

dominio variable de cadena alfa puede tener mutaciones del Grupo 6 y el dominio variable de cadena beta puede tener mutaciones del Grupo 4; el dominio variable de cadena alfa puede tener mutaciones del Grupo 5 y el dominio variable de cadena beta puede tener mutaciones del Grupo 4.

Además o como alternativa, las mutaciones pueden estar fuera de las CDR; estas mutaciones pueden mejorar la unión, y/o especificidad, y/o estabilidad, y/o el rendimiento de una forma soluble purificada del TCR. Por ejemplo, el TCR de la invención puede comprender, además o como alternativa, un dominio variable de cadena alfa que tiene las siguientes mutaciones respecto a la numeración de los residuos 1-113 de la SEQ ID NO: 2:

Residuo n.º	
K1	A
C19	V

(Tabla 3)

En el dominio variable de cadena alfa, la secuencia de residuos de aminoácido 27 - 32, 50 - 56 y 91 - 103 puede seleccionarse entre las siguientes:

Residuos 27 - 32 (CDR1)	Residuos 50 - 56 (CRD2)	Residuos 91 - 103 (CDR3)
VSPFSN	MTFSENT	VVNHSGGSYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNSANGLYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNHSGGSYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSASGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSAQGLYIPTF

(Tabla 4)

El dominio variable de cadena alfa del TCR puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 - 24 o 46 - 64.

En el dominio variable de cadena beta, la secuencia de residuos de aminoácido 27 - 31, 49 - 54 y 92 - 107 puede seleccionarse entre las siguientes:

Residuos 27 - 31 (CDR1)	Residuos 49 - 54 (CDR2)	Residuos 92 - 107 (CDR3)
MDHEN	SYDVKM	ASSFLMTSGDPYEQYF
MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
MDHEN	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF

(Tabla 5)

El dominio variable de cadena beta del TCR puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 - 29 o 65 - 81.

La secuencia de residuos de aminoácido 27-32, 50-56 y 91-103 del dominio variable de cadena alfa y la secuencia de residuos de aminoácido 27-31, 49-54 y 92-107 del dominio variable de cadena beta pueden seleccionarse entre las siguientes

Cadena alfa			Cadena beta		
27-32	50-56	91-103	27-31	49-54	92-107
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	MTFSENT	WNSANGLYIPTF	MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	WNSAQGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	WNSASGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF

(Tabla 6)

El dominio variable de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 a 24 o 46 - 64 y/o el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 a 29 o 65 - 81.

Por ejemplo, el dominio variable de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; el dominio variable de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27; el dominio variable

de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; el dominio variable de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; el dominio variable de cadena alfa puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y el dominio variable de cadena beta puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

El TCR de la invención puede ser un heterodímero alfa-beta, que tiene una secuencia de dominio constante de cadena alfa TRAC y una secuencia de dominio constante de cadena beta TRBC1 o TRBC2.

El TCR de la invención puede estar en un formato monocatenario que incluye, pero sin limitación, $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$, $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$ -C β , en donde $V\alpha$ y $V\beta$ son regiones variables α y β de TCR, respectivamente, C α y C β son regiones constantes α y β de TCR, respectivamente, y L es una secuencia enlazadora.

El TCR de la invención puede estar asociado con un marcador detectable, un agente terapéutico o un resto modificador de PK.

El TCR de la invención puede comprender un anticuerpo anti-CD3 unido covalentemente al extremo C o N de la cadena alfa o beta del TCR. Dicho TCR puede comprender un dominio variable de cadena alfa seleccionado entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 - 24 o 46 - 64 y un dominio variable de cadena beta seleccionado entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 - 29 o 65 - 81 fusionado a un anticuerpo anti-CD3. La cadena beta puede estar unida a la secuencia de anticuerpo anti-CD3 a través de una secuencia enlazadora; la secuencia enlazadora puede seleccionarse del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 30), GGGSG (SEQ ID NO: 31), GGSGG (SEQ ID NO: 32), GSGGG (SEQ ID NO: 33), GSGGGP (SEQ ID NO: 34), GGEPS (SEQ ID NO: 35), GGEGGGP (SEQ ID NO: 36) y GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37).

Las realizaciones preferidas de fusiones de TCR anti-CD3 comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena alfa seleccionada entre las SEQ ID NO: 38-41, o una secuencia que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38-41.

99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 38-41, y una secuencia de aminoácidos de cadena beta seleccionada entre las SEQ ID NO: 42-45, o una secuencia que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 42-45.

El TCR de la invención puede estar incluido en una biblioteca de partículas. Para estos fines, el TCR puede presentarse en la superficie de un bacteriófago, célula de levadura, célula de mamífero o ribosoma, por ejemplo. El TCR puede estar aislado, sin células y/o ser soluble, es decir, puede no ser un TCR que está en su estado natural en el interior de un linfocito T dentro de un ser humano.

Los TCR de la invención pueden ser no naturales y/o estar purificados y/o modificados por ingeniería genética. Los TCR de la invención pueden tener más de una mutación en el dominio variable de cadena alfa y/o el dominio variable de cadena beta con respecto al TCR de MAGE A4 nativo.

El TCR de la invención puede comprender una región marco 2 (FR2) de cadena alfa y una región marco 3 (FR3) de cadena alfa, en donde las regiones FR2 y FR3 comprenden las SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente, y/o contienen una o más, por ejemplo una, dos o tres, sustituciones conservativas y/o hasta tres sustituciones toleradas.

El TCR de la invención puede comprender una región FR2 de cadena beta y una región FR3 de cadena beta, en donde las regiones FR2 y FR3 comprenden las SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente, y/o contienen una o más, por ejemplo una, dos o tres, sustituciones conservativas y/o hasta tres sustituciones toleradas.

El TCR de la invención puede comprender los aminoácidos 1 -113 de la SEQ ID NO: 2 y/o los aminoácidos 1 - 116 de la SEQ ID NO: 3, pudiendo contener cada uno una o más sustituciones conservativas y/o hasta tres mutaciones toleradas y/o una o más de las mutaciones expuestas en las tablas 1, 2 y 3.

En el presente documento, "TCR modificado por ingeniería genética" y "TCR mutante" se usan como sinónimos para hacer referencia a un TCR que tiene una o más mutaciones introducidas

con respecto al TCR de MAGE A4 nativo, en particular, en el dominio variable de cadena alfa y/o el dominio variable de cadena beta del mismo. Las mutaciones habitualmente mejoran la capacidad de unión del TCR al complejo GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02, pero, además o como alternativa, confieren otras ventajas tales como una mejor estabilidad en una forma aislada y mejor especificidad. Las mutaciones en una o más posiciones pueden afectar, además o como alternativa, a la interacción de una posición adyacente con el complejo pMHC afín, por ejemplo, al permitir un ángulo más favorable para la interacción. Para mejorar la capacidad de unión del TCR al complejo GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02, las mutaciones preferentemente tienen lugar dentro de una o más de las regiones CDR.

En ciertas realizaciones, hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 mutaciones en las CDR de cadena alfa, por ejemplo, 4, 5 o 9 mutaciones, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones en las CDR de cadena beta, por ejemplo, 4, 9 o 10 mutaciones.

En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena α del TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con la secuencia de residuos de aminoácido 1-113 de la SEQ ID NO: 2, siempre que el dominio variable de cadena α tenga al menos una de las mutaciones indicadas anteriormente, por ejemplo, en la Tabla 1 o en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena β del TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con la secuencia de residuos de aminoácido 1-116 de la SEQ ID NO: 3, siempre que el dominio variable de cadena β tenga al menos una de las mutaciones indicadas anteriormente, por ejemplo, en la Tabla 2.

Las mutaciones en un TCR parental (o de tipo silvestre) pueden incluir las que pueden aumentar la afinidad de unión (k_D y/o semivida de unión) del TCR a GVDGREHTV. Las mutaciones pueden

incluir las que pueden reducir la cantidad de unión no específica, es decir, reducir la unión a antígenos además de la unión a GYDGREHTV. Las mutaciones pueden incluir las que aumentan la eficacia de plegamiento y/o fabricación. Algunas mutaciones pueden contribuir a cada una de estas características, otras pueden contribuir a la afinidad, pero no a la especificidad, por ejemplo, o a la especificidad pero no a la afinidad, etc.

Dentro del alcance de la invención se encuentran variantes fenotípicamente silenciosas de cualquier TCR de la invención desvelado en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "variantes fenotípicamente silenciosas" se refiere a un TCR que incorpora uno o más cambios de aminoácidos adicionales, entre los que se incluyen sustituciones, inserciones y deleciones, además de los expuestos anteriormente, teniendo dicho TCR un fenotipo similar al TCR correspondiente sin dicho(s) cambio(s). Para los fines de esta solicitud, el fenotipo del TCR comprende afinidad de unión a antígeno (K_D y/o semivida de unión) y especificidad de antígeno. Una variante fenotípicamente silenciosa puede tener una K_D y/o semivida de unión para el complejo GYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 dentro del 50 % o, más preferentemente, dentro del 20 %, de la K_D y/o semivida de unión medidas del TCR correspondiente sin dicho(s) cambio(s), cuando se miden en condiciones idénticas (por ejemplo, a 25°C y/o en el mismo chip de SPR). En el ejemplo 3 se proporcionan otras condiciones adecuadas. La especificidad del antígeno se define adicionalmente más adelante. Como saben los expertos en la materia, es posible producir TCR que incorporen cambios en sus dominios variables en comparación con los detallados anteriormente sin alterar la afinidad de la interacción con el complejo GYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02. En particular, estas mutaciones silenciosas pueden incorporarse dentro de partes de la secuencia que se sabe que no están implicadas directamente en la unión al antígeno (por ejemplo, las CDR, o partes de las CDR que no contactan con el antígeno peptídico). Estas variantes triviales se incluyen en el alcance de esta invención.

Las variantes fenotípicamente silenciosas pueden contener una o más sustituciones conservativas y/o una o más sustituciones

toleradas. Las sustituciones toleradas y conservativas pueden ocasionar un cambio en la K_D y/o semivida de unión para el complejo GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 dentro del 50 % o, más preferentemente, dentro del 20 %, incluso más preferentemente, dentro del 10 %, de la K_D y/o semivida de unión medidas del TCR correspondiente sin dicha(s) sustitución (sustituciones) conservativa(s) y/o tolerada(s), cuando se miden en condiciones idénticas (por ejemplo, a 25°C y/o en el mismo chip de SPR), siempre que el cambio en la K_D no haga que la afinidad sea menor de (es decir, más débil de) 200 μ m. Por sustituciones toleradas se entienden las sustituciones que no están incluidas en la definición de conservativa como se indica más adelante, pero que, sin embargo, son fenotípicamente silenciosas.

Los TCR de la presente invención pueden incluir una o más sustituciones conservativas que tienen una secuencia de aminoácidos similar y/o que conservan la misma función (es decir, son fenotípicamente silenciosas como se ha definido anteriormente). El experto en la materia es consciente de que diversos aminoácidos tienen propiedades similares y, por lo tanto, son 'conservativos'. Uno o más de estos aminoácidos de una proteína, polipéptido o péptido pueden sustituirse a menudo por uno o más aminoácidos distintos sin eliminar la actividad deseada de esa proteína, polipéptido o péptido.

De esta manera, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina pueden sustituirse a menudo entre sí (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones, se prefiere usar glicina y alanina para que se sustituyan entre sí (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y se prefiere usar valina, leucina e isoleucina para que se sustituyan entre sí (ya que tienen cadenas laterales alifáticas mayores que son hidrófobas). Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo entre sí, incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales

amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Debe apreciarse que las sustituciones de aminoácidos dentro del alcance de la presente invención pueden realizarse usando aminoácidos naturales o no naturales. Por ejemplo, en el presente documento se contempla que el grupo metilo de una alanina puede reemplazarse por un grupo etilo, y/o que pueden realizarse cambios minoritarios en la cadena principal del péptido. Se usen o no aminoácidos naturales o sintéticos, se prefiere que solo estén presentes L-aminoácidos.

Las sustituciones de esta naturaleza con frecuencia se denominan sustituciones de aminoácidos "conservativas" o "semiconservativas". Por lo tanto, la presente invención se extiende al uso de un TCR que comprende una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente pero con una o más sustituciones conservativas y/o una o más sustituciones toleradas en la secuencia, de tal manera que la secuencia de aminoácidos del TCR tiene al menos un 90 % de identidad, tal como un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad, con el TCR que comprende los aminoácidos 1 -113 de las SEQ ID NO: 2, 16-24 o 46-64, y/o los aminoácidos 1-116 de las SEQ ID NO: 3, 25 - 29 o 65 - 81.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, determinado por la correspondencia entre cadenas de dichas secuencias. Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos polipéptidos o dos secuencias polinucleotídicas, los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad están codificados en programas informáticos. Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete informático GCG (Devereux, et al., Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990)).

Se puede usar un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y encuentra el alineamiento óptimo insertando espacios en cualquier secuencia cuando es apropiado. Es posible calcular la identidad o similitud de aminoácidos (identidad más conservación del tipo de aminoácido) para un alineamiento óptimo. Un programa tal como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor a la concordancia. Por lo tanto, es posible obtener una comparación en la que se encuentren varias regiones de similitud, teniendo una puntuación diferente cada una. En la presente invención se contemplan los dos tipos de análisis de identidad.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico se determina alineando las secuencias con el fin de obtener una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la primera secuencia para conseguir el mejor alineamiento con la secuencia) y comparando los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones correspondientes. El "mejor alineamiento" es un alineamiento de dos secuencias que tiene como resultado el mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina por el número de residuos de aminoácido o nucleótidos idénticos en las secuencias a comparar (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la materia. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873- 5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 han incorporado dicho algoritmo. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico. Pueden realizarse búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para

obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína para uso en la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, Puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete informático de alineamiento de secuencias CGC ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para análisis de secuencias conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda.

En las secuencias proporcionadas pueden introducirse mutaciones, incluyendo sustituciones conservadas y toleradas, inserciones y deleciones, usando cualquier método apropiado entre los que se incluyen, pero sin limitación, los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación basada en enzimas de restricción o procedimientos de clonación independientes de ligamiento (LIC). Estos métodos están detallados en muchos de los textos convencionales de biología molecular. Si se desean más detalles en relación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación basada en enzimas de restricción, véase Sambrook & Russell, (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3^a Ed.) CSHL Press. Puede encontrarse más información sobre procedimientos de clonación independientes de ligamiento (LIC) en Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6(1): 30-6. Las secuencias de TCR proporcionadas por la invención pueden obtenerse por síntesis en estado sólido, o cualquier otro método apropiado conocido en la técnica.

Los TCR de la invención tienen la propiedad de unirse al complejo GYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02. Se ha descubierto que los TCR de la invención reconocen claramente este epítipo frente a otros epítopos irrelevantes y, por lo tanto, son particularmente adecuados como vectores de direccionamiento para la liberación de agentes terapéuticos o marcadores detectables en células y tejidos que presentan estos epítopos. La especificidad en el contexto de los TCR de la invención se refiere a su capacidad de reconocer células diana de HLA-A*02 que son positivas para el antígeno, y tener al mismo tiempo una capacidad mínima de reconocer células diana de HLA-A*02 que son negativas para el antígeno.

La especificidad puede medirse *in vitro*, por ejemplo, en ensayos celulares tales como los descritos en el ejemplo 6. Para ensayar la especificidad, los TCR pueden estar en forma soluble y/o pueden fusionarse a un efector inmunológico, y/o pueden expresarse en la superficie de células, tales como células T. El reconocimiento puede determinarse midiendo el nivel de activación de células T en presencia de un TCR de la invención y células diana. Un reconocimiento mínimo de las células diana negativas al antígeno se define como un nivel de activación de células T menor del 20 %, preferentemente menor del 10 %, preferentemente menor del 5 % y, más preferentemente, menor del 1 %, del nivel producido en presencia de células diana positivas para el antígeno, medido en las mismas condiciones y a una concentración de TCR terapéuticamente relevante. En el caso de los TCR solubles de la invención, una concentración terapéuticamente relevante puede definirse como una concentración de TCR de 10^{-9} M o inferior, y/o una concentración de hasta 100, preferentemente hasta 1000, veces mayor que el valor de CE50 correspondiente. Pueden obtenerse células positivas para el antígeno mediante la administración pulsátil de péptido, usando una concentración de péptido adecuada para obtener un nivel de presentación de antígenos comparable al de las células cancerosas (por ejemplo, péptido 10^{-9} M, como se describe en Bossi et al., (2013) Oncoimmunol. 1 ;2 (11) :e26840) o, dicho péptido puede estar presente de manera natural. Preferentemente, tanto las células positivas para el antígeno como negativas para el antígeno son células humanas. Preferentemente,

las células positivas para el antígeno son células cancerosas humanas. Las células negativas para el antígeno preferentemente incluyen las derivadas de tejidos humanos sanos.

La especificidad, además o como alternativa, puede estar relacionada con la capacidad de un TCR de unirse a un complejo GGYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 y no a un panel de complejos de péptido-HLA alternativos. Esto puede determinarse, por ejemplo, por el método Biacore del ejemplo 3. Dicho panel puede contener al menos 5 y, preferentemente, al menos 10, complejos de péptido-HLA-A*02 alternativos. Los péptidos alternativos pueden compartir un bajo nivel de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y pueden presentarse de manera natural. Los péptidos alternativos pueden derivar de proteínas expresadas en tejidos humanos sanos. La unión al complejo GGYDGREHTV-HLA-A*02 puede ser al menos 2 veces mayor que a otros complejos de péptido-HLA presentados de forma natural, Más preferentemente, al menos 10 veces, o al menos 50 veces o al menos 100 mayor, incluso más preferentemente al menos 400 veces mayor.

Un enfoque alternativo o adicional para determinar la especificidad del TCR puede ser identificar el motivo de reconocimiento de péptido del TCR usando mutagénesis secuencial, por ejemplo, mutagénesis mediante alanina. Los residuos que forman parte del motivo de unión son los que no se pueden utilizar (no son permisibles) para la sustitución. Las sustituciones no permisibles pueden definirse como las posiciones de péptidos en las que la afinidad de unión del TCR se reduce al menos un 50 %, o preferentemente al menos un 80 %, con respecto a la afinidad de unión por el péptido no mutado. Dicho enfoque se describe adicionalmente en Cameron et al., (2013), Sci Transl Med. 7 de agosto de 2013; 5 (197): 197ra103 y documento WO2014096803. La especificidad de TCR, en este caso, puede determinarse identificando péptidos que contienen motivos alternativos, particularmente péptidos que contienen motivos alternativos en el proteoma humano, y ensayando en estos péptidos la unión al TCR. La unión del TCR a uno o más péptidos alternativos puede indicar ausencia de especificidad. En este caso, puede requerirse un

ensayo adicional de especificidad de TCR a través de ensayos celulares.

Como saben los expertos en la materia, los péptidos derivados de miembros de la familia MAGE pueden compartir un alto nivel de identidad de secuencia con péptidos derivados de otros miembros de la familia MAGE. Por ejemplo, existen péptidos derivados de MAGE-A8 y MAGE-B2 que difieren únicamente en dos residuos de la SEQ ID NO 1 (GVYDGREHTV). Dichos péptidos y las células que expresan dichos miembros de la familia MAGE pueden excluirse de la definición de especificidad proporcionada anteriormente, particularmente, si se sabe que dichos miembros de la familia MAGE son antígenos de cáncer, tales como MAGE-A8 y MAGE-B2. Por lo tanto, los TCR de la invención pueden reconocer péptidos con un alto porcentaje de identidad de secuencia que proceden de otros miembros de la familia MAGE, incluyendo MAGE-A8 y MAGE-B2, y presentados en el contexto de HLA A*02. El reconocimiento de dichos péptidos por TCR de la invención puede estar a un nivel similar o inferior que el reconocimiento de GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02.

Ciertos TCR de la invención pueden tener un perfil de seguridad ideal para usarse como reactivos terapéuticos. En este caso, los TCR pueden estar en forma soluble y, preferentemente, pueden estar fusionados a un efector inmunológico. Un perfil de seguridad ideal significa que, además de demostrar una buena especificidad, los TCR de la invención pueden haber pasado ensayos preclínicos de seguridad adicionales. Los ejemplos de estos ensayos incluyen ensayos en sangre entera para confirmar la liberación mínima de citocinas en presencia de sangre entera y, por lo tanto, el bajo riesgo de causar un posible síndrome de liberación de citocinas *in vivo*, y ensayos de alorreactividad para confirmar la baja probabilidad de reconocimiento de tipos de HLA alternativos.

Ciertos TCR solubles de la invención pueden someterse a purificación de alto rendimiento. Alto rendimiento significa un rendimiento mayor del 1 % o, más preferentemente, mayor del 10 %, o superior.

Los TCR de la invención pueden tener una K_D para el complejo GYVDGREHTV-HLA-A*02 mayor de (es decir, más fuerte de) 200 μM , por ejemplo, comprendida entre 1 pM y 200 μM . Ciertos TCR de la invención pueden tener una K_D para el complejo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 400 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 200 pM, o de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM. Ciertos TCR de la invención pueden tener una K_D para el complejo de aproximadamente 20-80 pM. Los TCR de la invención pueden tener una semivida de unión ($T_{1/2}$) para el complejo en el intervalo de aproximadamente 1 seg a aproximadamente 60 h, de 1 min a aproximadamente 60 h, de aproximadamente 20 min a aproximadamente 50 h, o de aproximadamente 2 h a aproximadamente 35 h. Ciertos TCR de la invención pueden tener un valor de $T_{1/2}$ para el complejo de aproximadamente 8 h a 35 h. Los TCR que son de utilidad como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico solubles cuando se acoplan a un marcador detectable o agente terapéutico, preferentemente tienen un valor de K_D para el complejo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM, o de aproximadamente 20 pM a aproximadamente 80 pM, y/o una semivida de unión para el complejo de aproximadamente 2 h a 60 h, o de aproximadamente 8 h a aproximadamente 35 h. Ciertos TCR de la invención pueden ser adecuados para aplicaciones de terapia adoptiva; y estos TCR pueden tener una K_D para el complejo de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 200 μM , o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μM y/o una semivida de unión para el complejo de aproximadamente 3 seg a aproximadamente 12 min.

Ciertos TCR preferidos pueden generar una respuesta de células T muy potente *in vitro* contra células positivas para antígenos, en particular, las células que presentan bajos niveles de antígenos típicos de las células cancerosas (es decir, aproximadamente 50 antígenos por célula (Bossi *et al*, (2013) Oncoimmunol. 1;2 (11):e26840; Purbhoo *et al.*, (2006). J Immunol 176(12): 7308-7316.)). Estos TCR pueden estar en forma soluble y asociados a un efector inmunológico tal como un anticuerpo anti-CD3. La respuesta de células T que se mide puede ser la liberación de marcadores de activación de células T tales como Interferón γ o Granzima B, o la

destrucción de células, u otra medida de activación de células T. Preferentemente, una respuesta muy potente es una con un valor de CE_{50} en el intervalo pM, por ejemplo, de 100 pM o menor.

Ciertos TCR preferidos de la invención tienen una afinidad de unión por, y/o una semivida de unión para el complejo GVDGREHTV-HLA-A*02 sustancialmente mayor que la del TCR nativo. El aumento de la afinidad de unión de un TCR nativo a menudo reduce la especificidad del TCR por su ligando de péptido-MHC, y esto se demuestra en Zhao *et al*, (2007) J.Immunol, 179:9, 5845-5854. Sin embargo, estos TCR de la invención siguen siendo específicos por el complejo GVDGREHTV-HLA-A*02, a pesar de tener una afinidad de unión sustancialmente mayor que el TCR nativo.

La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio K_D) y la semivida de unión (expresada como $T_{1/2}$) pueden determinarse usando la Resonancia de Plasmones Superficiales (BIAcore) y/o el método Octet del ejemplo 3 del presente documento. Se apreciará que la duplicación de la afinidad de un TCR tiene como resultado la reducción a la mitad de la K_D . El valor de $T_{1/2}$ se calcula como $\ln 2$ dividido por la tasa de disociación (k_{off}). Por lo tanto, la duplicación de $T_{1/2}$ tiene como resultado la reducción a la mitad de k_{off} . Los valores de K_D y k_{off} para los TCR normalmente se miden para formas solubles del TCR, es decir, las formas que se han truncado para retirar residuos de los dominios citoplásmico y transmembrana. Preferentemente, la afinidad de unión o la semivida de unión de un TCR dado se mide varias veces, por ejemplo 3 o más veces, usando el mismo protocolo de ensayo y se coge una media de los resultados.

Para uso como agente de direccionamiento para liberar agentes terapéuticos en la célula presentadora de antígeno, el TCR puede estar en forma soluble (es decir, que no tiene dominios citoplásmico ni transmembrana). Para tener estabilidad, los TCR de la invención, y preferentemente los TCR heterodiméricos $\alpha\beta$ solubles, pueden tener un enlace disulfuro introducido entre residuos de los dominios constantes respectivos, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Uno o los dos dominios constantes extracelulares presentes en un heterodímero $\alpha\beta$ de la invención pueden estar truncados en el extremo C o en los extremos

C, por ejemplo, en hasta 15, o hasta 10 o hasta 8 o menos aminoácidos. El extremo C del dominio constante extracelular de cadena alfa puede estar truncado en 8 aminoácidos. Uno o los dos dominios constantes extracelulares pueden contener una o más mutaciones. El dominio constante extracelular de cadena alfa puede tener un residuo de asparagina (N) o un residuo de lisina (K) en la posición 4 debido a un polimorfismo natural. Para uso en terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ puede transfectarse, por ejemplo, como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplásmicos como transmembrana. Los TCR para uso en terapia adoptiva pueden contener un enlace disulfuro correspondiente al encontrado en la naturaleza entre los dominios constantes alfa y beta respectivos, además o como alternativa, puede estar presente un enlace disulfuro no nativo.

Los TCR de la invención pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$. Los TCR de la invención pueden estar en formato monocatenario. Los formatos monocatenarios incluyen, pero sin limitación, polipéptidos $\alpha\beta$ de TCR de los tipos $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ o $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$, en donde $V\alpha$ y $V\beta$ son regiones variables α y β de TCR, respectivamente, $C\alpha$ y $C\beta$ son regiones constantes α y β de TCR, respectivamente, y L es una secuencia enlazadora (Weidanz et al., (1998) J Immunol Methods. Dec 1;221(1-2):59-76; Epel et al., (2002), Cancer Immunol Immunother. Nov;51(10):565-73; documento WO 2004/033685; documento WO9918129). Uno o los dos dominios constantes pueden ser de longitud completa o pueden estar truncados como se ha descrito anteriormente, y/o contener mutaciones. El dominio constante extracelular de cadena alfa puede tener un residuo de asparagina (N) o un residuo de lisina (K) en la posición 4 debido a un polimorfismo natural. En ciertas realizaciones, los TCR monocatenarios de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido entre residuos de los dominios constantes respectivos, como se describe en el documento WO 2004/033685. También se describen TCR monocatenarios en los documentos WO2004/033685; WO98/39482; WO01/62908; Weidanz et al. (1998) J Immunol Methods 221(1-2): 59-76; Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763; Schodin (1996) Mol Immunol 33(9): 819-829).

Como será evidente para los expertos en la materia, es posible truncar las secuencias proporcionadas en su extremo C y/o en su extremo N en 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos, sin que resulten afectadas sustancialmente las características de unión del TCR. Todas estas variantes triviales están incluidas en la presente invención.

Los TCR heterodiméricos alfa-beta de la invención normalmente comprenden una secuencia de dominio constante de cadena alfa TRAC y/o una secuencia de dominio constante de cadena beta TRBC1 o TRBC2. Las secuencias de dominio constante de cadena alfa y beta pueden modificarse por truncamiento o sustitución para eliminar el enlace disulfuro nativo entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2. La(s) secuencia(s) de dominio constante de cadena alfa y/o beta pueden modificarse por sustitución con residuos de cisteína de la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del TCR. TRBC1 o TRBC2 pueden incluir además una mutación de cisteína a alanina en la posición 75 del dominio constante y una mutación de asparagina a ácido aspártico en la posición 89 del dominio constante. El dominio constante puede contener, además o como alternativa, mutaciones, sustituciones o deleciones con respecto a las secuencias nativas de TRAC y/o TRBC1/2. Los términos TRAC y TRBC1/2 incluyen variantes polimórficas naturales, por ejemplo, de N a K en la posición 4 de TRAC (Bragado et al Int Immunol. 1994 Feb;6(2):223-30).

También se incluyen dentro del alcance de la invención variantes, fragmentos y derivados de los TCR proporcionados por la invención.

La invención también incluye partículas que presentan TCR de la invención y la inclusión de dichas partículas dentro de una biblioteca de partículas. Dichas partículas incluyen, pero sin limitación, fagos, ribosomas de levadura o células de mamífero. En la técnica se conocen métodos para producir dichas partículas y bibliotecas (por ejemplo, véanse los documentos WO2004/044004; WO01/48145, Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácido nucleico que codifica un TCR de la invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADNc. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena α de un TCR de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena β de un TCR de la invención. El ácido nucleico puede ser no natural y/o estar purificado y/o modificado por ingeniería genética. La secuencia de ácido nucleico puede tener codones optimizados, de acuerdo con el sistema de expresión utilizado.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende ácido nucleico de la invención. Preferentemente, el vector es un vector de expresión de TCR.

La invención también proporciona una célula que alberga un vector de la invención, preferentemente un vector de expresión de TCR. El vector puede comprender ácido nucleico de la invención que codifica en una sola fase de lectura abierta, o en dos fases de lectura abiertas distintas que codifican la cadena alfa y la cadena beta respectivamente. Otro aspecto proporciona una célula que alberga un primer vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena alfa de un TCR de la invención, y un segundo vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica la cadena beta de un TCR de la invención. Estas células son particularmente útiles en terapia adoptiva. Las células de la invención pueden estar aisladas y/o ser recombinantes y/o no ser naturales y/o estar modificadas por ingeniería genética.

Como los TCR de la invención tienen utilidad en terapia adoptiva, la invención incluye una célula no natural y/o purificada y/o modificada por ingeniería genética, especialmente una célula T, que presenta un TCR de la invención. La invención también proporciona una población expandida de células T que presentan un TCR de la invención. Existen varios métodos adecuados para la transfección de células T con ácido nucleico (tal como ADN, ADNc o ARN) que codifica los TCR de la invención (véase, por ejemplo, Robbins *et al.*, (2008) *J Immunol.* 180:6116-6131). Las

células T que expresan los TCR de la invención serán adecuadas para usarse en el tratamiento de cánceres basado en terapia adoptiva. Como sabrán los expertos en la materia, existen varios métodos adecuados mediante los cuales se puede realizar la terapia adoptiva (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4): 299-308).

Los TCR solubles de la invención son útiles para liberar marcadores detectables o agentes terapéuticos en células presentadoras de antígeno y tejidos que contienen células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, pueden asociarse (covalentemente o de otra manera) con un marcador detectable (con fines de diagnóstico en donde el TCR se usa para detectar la presencia de células que presentan el complejo GYDGREHTV-HLA-A*02); un agente terapéutico; o un resto modificador de PK.

Los ejemplos de restos modificadores de PK incluyen, pero sin limitación, PEG (Dozier *et al.*, (2015) *Int J Mol Sci.* Oct 28;16(10):25831-64 y Jevsevar *et al.*, (2010) *Biotechnol J.* Jan;5(1):113-28), PASylation (Schlapschy *et al.*, (2013) *Protein Eng Des Sel.* Aug;26(8):489-501), albúmina (Dennis *et al.*, (2002) *J Biol Chem.* Sep 20;277(38):35035-43) y/o polipéptidos no estructurados (Schellenberger *et al.*, (2009) *Nat Biotechnol.* Dec;27(12):1186-90).

Los marcadores detectables con fines de diagnóstico incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sondas de ácido nucleico y reactivos de contraste.

Los agentes terapéuticos que pueden asociarse con los TCR de la invención incluyen inmunomoduladores, compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (cisplatino, por ejemplo). Para asegurar que se proporcionan efectos tóxicos en la localización deseada, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido al TCR de manera que el compuesto se libera lentamente. Esto prevendrá que se produzcan efectos perjudiciales durante el transporte en el cuerpo y asegurará que la toxina tiene un efecto máximo después de la unión del TCR a la célula presentadora de antígeno relevante.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de destruir células de mamífero que tienen un peso molecular menor de 700 Daltons. Estos compuestos también podrían contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Los ejemplos de estos agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, porfímero sódico photofrin II, temozolomida, topotecán, trimetrexato 21arbour21ate, auristatina E vincristina y doxorubicina;
- citotoxinas peptídicas, es decir, proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de destruir células de mamífero. Por ejemplo, ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de pseudomonas, Dnasa y Rnasa;
- radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se descomponen con la emisión concurrente de uno o más de los siguientes: partículas α o β o rayos γ . Por ejemplo, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astatina 213; pueden usarse agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos a los TCR de alta afinidad, o multímeros de los mismos;
- Inmunoestimuladores, es decir, moléculas efectoras inmunológicas que estimulan la respuesta inmunológica. Por ejemplo, citocinas tales como IL-2 e IFN- γ ,
- Superantígenos y mutantes de los mismos;
- fusiones TCR-HLA, por ejemplo, fusión a un complejo de péptido-HLA, en donde dicho péptido deriva de un patógeno humano común, tal como el virus de Epstein Barr (EBV);
- quimioquinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanoma, etc.;
- anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo anticuerpos anti-células T o determinantes de células NK (por ejemplo, anti-CD3, anti-CD28 o anti-CD16);

- armazones de proteína alternativos con características de unión similares a las de los anticuerpos
- activadores del complemento;
- dominios de proteína xenogénicos, dominios de proteína alogénicos, dominios de proteína viral/bacteriana, péptidos virales/bacterianos.

Se proporciona una realización preferida por un TCR de la invención asociado (normalmente por fusión a un extremo N o C de la cadena alfa o beta) con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo anti-CD3 (dichas fusiones TCR-anti-CD3 pueden denominarse moléculas ImmTAC™). Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye dichos fragmentos y variantes. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD3 incluyen, pero sin limitación, OKT3, UCHT-1, BMA-031 y 12F6. Los fragmentos de anticuerpo y variantes/análogos que son adecuados para usarse en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen minicuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos dsFv y scFv, Nanobodies™ (estas construcciones, comercializadas por Ablynx (Bélgica), comprenden un solo dominio pesado variable de inmunoglobulina sintético derivado de un anticuerpo de camélido (por ejemplo, camello o llama)) y Anticuerpos de Dominio (Domantis (Bélgica), que comprenden un solo dominio pesado variable o dominio ligero variable de inmunoglobulina de afinidad madurada) o armazones de proteína alternativos que presentan características de unión similares a las de los anticuerpos tales como Aficuerpos (Affibody (Suecia), que comprenden armazón de proteína A modificada por ingeniería genética) o Anticalinas (Pieris (Alemania)), que comprenden anticalinas modificadas por ingeniería genética) por nombrar solo algunos.

El enlace del TCR y el anticuerpo anti-CD3 puede realizarse a través de unión covalente o no covalente. La unión covalente puede ser directa o indirecta a través de una secuencia enlazadora. Las secuencias enlazadoras normalmente son flexibles, ya que están constituidas principalmente por aminoácidos tales como glicina, alanina y serina que no tienen cadenas laterales voluminosas que probablemente restringirían la flexibilidad. Las longitudes que

pueden utilizarse u óptimas de las secuencias enlazadoras se determinan fácilmente. A menudo, la secuencia enlazadora tendrá menos de aproximadamente 12, tal como menos de 10, o de 2 a 10 aminoácidos de longitud. Los enlazadores adecuados que pueden usarse en los TCR de la invención incluyen, pero sin limitación: GGGGS (SEQ ID NO: 30), GGGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GSGGG (SEQ ID NO: 33), GSGGGP (SEQ ID NO: 34), GGEPS (SEQ ID NO: 35), GGEGGGP (SEQ ID NO: 36) y GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37) (como se describe en el documento WO2010/133828).

Las realizaciones específicas de construcciones de fusión anti-CD3-TCR de la invención incluyen los emparejamientos de cadena alfa y cadena beta en los que la cadena alfa está compuesta de un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 - 24 o 46 - 64 y/o la cadena beta está compuesta de un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 25 - 29 o 65 - 81. Dichas cadenas alfa y beta pueden comprender además una región constante que comprende un enlace disulfuro no nativo. El extremo N o C de la cadena alfa y/o beta puede fusionarse a un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD3 a través de un enlazador seleccionado entre las SEQ ID NO: 30 - 37. A continuación se proporcionan ciertas realizaciones preferidas de dichas construcciones de fusión anti-CD3-TCR:

Cadena alfa SEQ ID NO	Cadena beta SEQ ID NO
38	42
38	43
39	44
40	45
41	45

(Tabla 7)

Cada enlazador de las SEQ ID NO: 30-37 puede usarse con todas y cada una de las realizaciones preferidas de las construcciones de fusión CD3-TCR. Por ejemplo, en la invención se incluye una fusión TCR-CD3 que comprende la cadena alfa de la SEQ ID NO: 24 y la cadena beta de la SEQ ID NO: 29, en donde la cadena beta está fusionada a un scFv anti-CD3 a través de un enlazador de cualquiera de las SEQ ID NO: 31-37.

Para algunos fines, los TCR de la invención pueden agregarse en un complejo que comprende varios TCR formando un complejo de TCR multivalente. Existen varias proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que puede usarse en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha utilizado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpo scFv que presentó una mayor persistencia en suero y una tasa de disociación reducida significativamente en comparación con el fragmento scFv monomérico (Willuda *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392). La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que podría usarse para este tipo de aplicación. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede tener una capacidad de unión aumentada para el complejo GGYDGREHTV-HLA-A*02 en comparación con un heterodímero de receptor de células T o de tipo silvestre no multimérico de la invención. Por lo tanto, también se incluyen dentro de la invención complejos multivalentes de TCR de la invención. Dichos complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención son particularmente útiles para el rastreo o establecimiento como diana de células que presentan antígenos particulares *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermedios para la producción de complejos de TCR multivalentes adicionales que tienen dichos usos.

Como es bien sabido en la técnica, Los TCR pueden someterse a modificaciones postraduccionales. La glicosilación es una de estas modificaciones, que comprende la unión covalente de residuos de oligosacárido a residuos de aminoácido definidos en la cadena del TCR. Por ejemplo, son localizaciones bien conocidas para la unión de oligosacáridos residuos de asparagina o residuos de serina/treonina. El estado de glicosilación de una proteína particular depende de varios factores, incluyendo la secuencia de la proteína, la conformación de la proteína y la disponibilidad de ciertas enzimas. Además, el estado de glicosilación (es decir, el tipo de oligosacárido, el enlace covalente y el número total de uniones) puede influir en la función de la proteína. Por lo tanto, cuando se producen proteínas recombinantes, a menudo es deseable controlar la glicosilación. Se ha usado glicosilación controlada

para mejorar los agentes terapéuticos basados en anticuerpos. (Jefferis *et al.*, (2009) *Nat Rev Drug Discov* Mar;8(3):226-34.). En caso de los TCR solubles de la invención, la glicosilación puede controlarse *in vivo*, usando líneas celulares particulares, por ejemplo, o *in vitro*, mediante modificación química. Dichas modificaciones son deseables, ya que la glicosilación puede mejorar la farmacocinética, reducir la inmunogenicidad y mejorar la imitación de una proteína humana nativa (Sinclair y Elliott, (2005) *Pharm Sci*.Aug; 94(8):1626-35).

Para la administración a los pacientes, los TCR de la invención (preferentemente asociados con un marcador detectable o agente terapéutico o expresados en una célula C transfectada), moléculas de fusión TCR-anti CD3, ácidos nucleicos, vectores de expresión o células de la invención, pueden proporcionarse en una composición farmacéutica junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los TCR terapéuticos o de formación de imágenes, o células, de acuerdo con la invención normalmente se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del método deseado de administración a un paciente). Puede proporcionarse en forma de dosificación unitaria, generalmente se proporcionará en un recipiente cerrado herméticamente y puede proporcionarse como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluye instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitaria.

La composición farmacéutica puede adaptarse para la administración por cualquier vía apropiada, tal como la vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o intravenosa), entérica (incluyendo oral o rectal), por inhalación o intranasal. Dichas composiciones pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con el o los vehículos 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 a tratar, la edad y afección del individuo a tratar, etc. Un intervalo de dosis adecuado para un TCR soluble de la invención asociado con un anticuerpo anti-CD3 puede estar comprendido entre 25 ng/kg y 50 µg/kg. Un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas a utilizar.

Los TCR, composiciones farmacéuticas, vectores, ácidos nucleicos y células de la invención, pueden proporcionarse en forma sustancialmente pura, por ejemplo, con al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de pureza.

La invención también proporciona:

- Un TCR, molécula de fusión de TCR anti-CD3, ácido nucleico, composición farmacéutica o célula de la invención para uso en medicina, preferentemente, para uso en un método de tratamiento de un cáncer o un tumor;
- el uso de un TCR, molécula de fusión de TCR anti-CD3, ácido nucleico, composición farmacéutica o célula de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o un tumor;
- un método para el tratamiento de un cáncer o un tumor en un paciente, que comprende administrar al paciente TCR, molécula de fusión de TCR anti-CD3, ácido nucleico, composición farmacéutica o célula de la invención;
- una formulación inyectable para administración a un sujeto humano, que comprende un TCR, molécula de fusión de TCR anti-CD3, ácido nucleico, composición farmacéutica o célula de la invención.

El cáncer puede ser de mama, esófago, cabeza y cuello, pulmón, ovario o vejiga. El tumor puede expresar MAGE A4, y/o puede ser un tumor sólido. El TCR, molécula de fusión de TCR anti-CD3, ácido nucleico, composición farmacéutica o célula de la invención pueden administrarse por inyección, tal como inyección intravenosa o intratumoral directa. El sujeto humano puede ser del subtipo HLA-A*02.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención se aplican a cada uno de los otros aspectos cambiando lo que corresponda. Los documentos de la técnica anterior mencionados en el presente documento se incorporan en la máxima medida permitida por la ley.

Descripción de los Dibujos

Figura 1 - proporciona la secuencia de aminoácidos de las regiones extracelulares de una cadena alfa y beta de TCR de MAGE A4 nativo.

Figura 2 - proporciona la secuencia de aminoácidos de las regiones extracelulares de una cadena alfa y beta de TCR de MAGE A4 nativo soluble.

Figura 3 - proporciona secuencias de aminoácidos ejemplares de regiones variables de cadena alfa de TCR de MAGE A4 mutado.

Figura 4 - proporciona secuencias de aminoácidos ejemplares de regiones variables de cadena beta de TCR de MAGE A4 mutado.

Figura 5 - proporciona secuencias de aminoácidos de cadena alfa ejemplares de moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 6 - proporciona secuencias de aminoácidos de cadena beta ejemplares de moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 7 - proporciona datos celulares que demuestran la potencia y especificidad de moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 8 - proporciona datos celulares que demuestran la potencia y especificidad de otras moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 9 - proporciona pruebas adicionales de la especificidad de moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 10 - proporciona datos adicionales de especificidad para moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3.

Figura 11 - proporciona pruebas de que moléculas de fusión de TCR de MAGE A4-anti-CD3 ocasionan la destrucción de células cancerosas.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Expresión, replegamiento y purificación de TCR solubles

Método

Se clonaron por separado secuencias de ADN que codifican las regiones extracelulares alfa y beta de TCR solubles de la invención en plásmidos de expresión basados en pGMT7 usando métodos convencionales (como se describe en Sambrook, et al. *Molecular cloning*. Vol. 2. (1989) Nueva York: Cold spring harbour laboratory press). Los plásmidos de expresión se introdujeron por separado en la cepa Rosetta de *E. coli* (BL21pLysS) y se cultivaron colonias resistentes a ampicilina individuales a 37°C en medio TYP (+ ampicilina a 100 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de ~0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM.

Las células se recogieron tres horas después de la inducción por centrifugación. Los sedimentos celulares se lisaron con reactivo de extracción de proteínas BugBuster (Merck Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recuperaron sedimentos de cuerpos de inclusión por centrifugación. Los sedimentos se lavaron dos veces en tampón Triton (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, Triton-X100 al 0,5 %, NaCl 100 mM, NaEDTA 10 mM) y finalmente se resuspendieron en tampón sin detergente (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, NaEDTA 10 mM). El rendimiento de proteína de cuerpo de inclusión se cuantificó solubilizando con guanidina-HCl 6 M y midiendo la DO₂₈₀. Después se calculó la concentración de proteína usando el coeficiente de extinción. La pureza de los cuerpos de inclusión se midió solubilizando con Urea 8 M y cargando ~2 µg en SDS-PAGE al 4-20 % en condiciones reductoras. Después se estimó o calculó la pureza usando un paquete informático de densitometría (Chemidoc, Biorad). Se almacenaron cuerpos de inclusión a +4°C para un almacenamiento a corto plazo y a -20°C o a -70°C para un almacenamiento más prolongado.

En relación con el replegamiento del TCR soluble, primero se mezclaron cuerpos de inclusión que contenían cadena α y β y se diluyeron en 10 ml de tampón de solubilización/desnaturalización (Clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 20 mM) y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después se inició el replegamiento mediante

dilución adicional en 1 l de tampón de replegamiento (Tris 100 mM pH 8,1, L-Arginina HCl 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 4 M, clorhidrato de cisteamina 10 mM y dichlorhidrato de cistamina 2,5 mM) y la solución se mezcló bien. La mezcla replegada se dializó frente a 10 l de H₂O durante 18-20 horas a 5 °C ± 3 °C. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se reemplazó dos veces con Tris 10 mM pH 8,1 (10 l) y se continuó la diálisis durante otras 15 horas. La mezcla replegada después se filtró a través de filtros de celulosa de 0,45 µm.

La purificación de los TCR solubles se inició mediante la aplicación del replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS® 50HQ y la elución de la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en Tris 20 mM pH 8,1 con 50 volúmenes de columna usando un purificador Akta® (GE Healthcare). Las fracciones con pico de TCR se identificaron mediante SDS PAGE antes de reunirse y concentrarse. La muestra concentrada después se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex® 75HR (GE Healthcare) preequilibrada en tampón PBS de Dulbecco. Las fracciones con pico de TCR se reunieron y se concentraron y se calculó el rendimiento final de material purificado.

Ejemplo 2 - Expresión, replegamiento y purificación de moléculas ImmTAC (moléculas de fusión de TCR soluble- anti CD3)

Método

La preparación de ImmTAC se realizó como se describe en el ejemplo 1, con la excepción de que la cadena beta de TCR se fusionó a través de un enlazador a un anticuerpo monocatenario anti-CD3. Además, se realizó una etapa de intercambio catiónico durante la purificación después del intercambio aniónico. En este caso, las fracciones pico del intercambio aniónico se diluyeron 20 veces en MES 20 mM (pH 6,5) y se aplicaron a una columna de intercambio catiónico POROS® 50HS. La proteína unida se eluyó con un gradiente de NaCl 0-500 mM en MES 20 mM. Las fracciones pico de ImmTAC se reunieron y se ajustaron a Tris 50 mM pH 8,1, antes de concentrarse y aplicarse directamente a la matriz de filtración en gel como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3 - Caracterización de la unión

El análisis de unión de TCR solubles purificados y moléculas ImmTAC al complejo de péptido-HLA relevante se realizó por resonancia de plasmones superficiales, usando un instrumento BIAcore 3000 o BIAcore T200 o mediante interferometría de biocapa, usando un instrumento ForteBio Octet). Se replegaron moléculas de HLA-A*02 de clase I biotiniladas con el péptido de interés y se purificaron usando métodos conocidos por los expertos en la materia (O'Callaghan et al. (1999). Anal Biochem 266(1): 9-15; Garboczi, et al. (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89(8): 3429-3433). Todas las mediciones se realizaron a 25°C en tampón PBS de Dulbecco, complementado con P20 al 0,005 %.

Método BIAcore

Se inmovilizaron monómeros de péptido-HLA biotinilados en chips sensores CM-5 acoplados a estreptavidina. Las constantes de unión en equilibrio se determinaron usando diluciones seriadas de TCR soluble / ImmTAC inyectadas a un caudal constante de 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ sobre una celda de flujo recubierta con ~200 unidades de respuesta (UR) de complejo de péptido-HLA-A*02. Las respuestas de equilibrio se normalizaron para cada concentración de TCR restando la respuesta masiva al tampón en una celda de flujo de control que contenía un péptido-HLA irrelevante. El valor de K_D se obtuvo mediante ajuste de curvas no lineal usando el paquete informático Prism y la isoterma de unión de Langmuir, $\text{unido} = C \cdot \text{Máx} / (C + K_D)$, donde "unido" es la unión en equilibrio en UR a la concentración C de TCR inyectado y Máx es la unión máxima.

Para interacciones de alta afinidad, los parámetros de unión se determinaron mediante análisis cinéticos de un solo ciclo. Se inyectaron cinco concentraciones diferentes de TCR soluble/ImmTAC en una celda de flujo recubierta con ~100 - 200 UR de complejo de péptido-HLA usando un caudal de 50-60 $\mu\text{l min}^{-1}$. Típicamente, se inyectaron 60-120 μl de TCR soluble/ImmTAC a una concentración superior de 100-200 nM, usando 2 diluciones sucesivas de dos veces para las otras cuatro inyecciones. Primero se inyectó la menor concentración. para medir la fase de disociación, después se inyectó tampón hasta que se produjo ≥ 10 % de disociación, típicamente después de 1 - 3 horas. Los parámetros cinéticos se calcularon usando el paquete informático BIAevaluation®. La fase

de disociación se ajustó a una sola ecuación de descomposición exponencial que permitía el cálculo de la semivida. La constante de equilibrio K_D se calculó a partir de k_{off}/k_{on} .

Método Octet

Se capturaron monómeros de péptido-HLA biotinilados a una concentración 1 nM en biosensores de estreptavidina (SA) (Pall ForteBio) preinmovilizados con estreptavidina. Los sensores se bloquearon con biotina libre (2 μ M) durante 2 minutos. Las constantes de unión de equilibrio se determinaron sumergiendo los biosensores cargados en TCR soluble/ImmTAC diluido en serie en una placa de muestra de 96 pocillos o 384 pocillos. La agitación de la placa se fijó a 1000 rpm. Para las interacciones de baja afinidad (intervalo μ M), se usaron una asociación corta (~2 minutos) y un tiempo de disociación corto (~2 minutos). Las curvas de unión se procesaron mediante la resta de doble referencia de los biosensores de referencia cargados con pHLA irrelevante usando el paquete informático de análisis de datos Octet (Pall ForteBio). Se usaron respuestas (nm) en equilibrio para estimar el valor de K_D a partir de gráficas de estado estacionario ajustadas a la ecuación $\text{Respuesta} = R_{\text{máx}} \cdot \text{conc} / (K_D + \text{conc})$, donde "respuesta" es la unión en equilibrio en nm a cada concentración de TCR (conc) y $R_{\text{máx}}$ es la respuesta de unión máxima a la saturación de pHLA.

Para las interacciones de alta afinidad (intervalo nM - pM), los parámetros cinéticos se determinaron a partir de las curvas de unión a ≥ 3 concentraciones de TCR/ImmTAC típicamente de 10 nM, 5 nM y 2,5 nM. El tiempo de asociación fue de 30 minutos y el tiempo de disociación de 1 - 2 horas. Las curvas de unión se procesaron mediante la resta de doble referencia de los biosensores de referencia cargados con pHLA irrelevante y bloqueados con biotina. Los parámetros cinéticos k_{on} y k_{off} se calcularon por ajuste global directamente a las curvas de unión usando el paquete informático de análisis de datos Octet (Pall ForteBio). La K_D se calculó a partir de k_{off}/k_{on} y la semivida de disociación se calculó a partir de $t_{1/2} = 0,693/k_{off}$.

Ejemplo 4 - Caracterización de unión del TCR nativo

Se preparó un TCR nativo soluble de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 1 y se analizó la unión a pHLA de acuerdo

con el ejemplo 3. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa y beta correspondían a las mostradas en la figura 2. Se preparó HLA-A*02 biotinilado soluble con el péptido de MAGE A4 GGYDGREHTV y se inmovilizó en un chip sensor BIAcore.

Resultados

Se determinó la unión a diversas concentraciones y se determinó un valor de K_D para la interacción de 142 μ M. Se evaluó la reactividad cruzada (especificidad) frente a un panel de 15 complejos de péptido HLA-A*02 irrelevantes usando el método BIAcore de equilibrio del ejemplo 3. Los 15 pHLA irrelevantes se reunieron en tres grupos y se cargaron en una de tres celdas de flujo, proporcionando aproximadamente 1000 UR de cada pHLA por celda de flujo. Se inyectaron 20 μ l de TCR de tipo silvestre a concentraciones de 73 μ M en todas las celdas de flujo a un caudal de 20 μ l/min. No se detectó unión significativa a ninguna concentración, lo que indica que el TCR nativo es específico para el complejo GGYDGREHTV-HLA-A*02.

Estos datos indican que este TCR se une a la diana con una afinidad y especificidad adecuadas y, por lo tanto, proporciona una secuencia de partida útil para TCR terapéuticos.

Ejemplo 5 - Caracterización de unión de TCR mutados solubles y moléculas ImmTAC de la invención

Se produjeron TCR mutados solubles y moléculas ImmTAC basándose en las secuencias mostradas en la figura 2. Se prepararon muestras como se describe en los ejemplos 1 y 2, y se determinaron las características de unión de acuerdo con el ejemplo 3.

Resultados

Se observó que una sola mutación puntual de cisteína a valina en la posición 19 de la cadena alfa (SEQ ID NO: 6) mejoraba el rendimiento de replegamiento y purificación sin afectar a la afinidad o especificidad (se registró un valor de K_D de 145 μ M y no se observó reactividad cruzada con el mismo panel de 15 complejos alternativos de péptido-HLA que se ensayaron con el tipo silvestre).

Se identificó que las cadenas alfa y/o beta de TCR contenían mutaciones en al menos una región CDR con respecto a las

secuencias de CDR mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO: 4 y 5). Estas secuencias de TCR reconocieron el complejo GVDGREHTV HLA-A*02 con una afinidad y/o semivida particularmente adecuadas.

En algunos casos, se identificaron mutaciones adicionales que mejoraban la estabilidad y/o rendimiento del TCR, entre las que se incluyen la mutación de la cadena alfa K1A (respecto a la numeración de la SEQ ID NO: 4). En las figuras 4 y 5 se proporcionan, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones variables de cadena alfa y beta de TCR mutado. La siguiente tabla proporciona características de unión para TCR solubles o moléculas ImmTAC (moléculas de fusión de TCR soluble anti-CD3) que comprenden las regiones variables alfa y beta indicadas.

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	Formato (TCR soluble o ImmTAC)	Método (Biacore / Octet)	Parámetros de unión	
				KD	T _{1/2}
WTc19v (16)	b1 (25)	TCR soluble	Biacore	330 nM	>2 min
a7 (17)	b1 (25)	TCR soluble	Octet	nd	24 min
a12 (18)	b1 (25)	TCR soluble	Octet	nd	24 min
a13 (19)	b1 (25)	TCR soluble	Octet	nd	144 min
a19 (21)	b1 (25)	TCR soluble	Octet	nd	7,2 h
WTc19v (16)	b14 (26)	TCR soluble	Octet	nd	10 min
WTc19v (16)	b21 (28)	TCR soluble	Octet	nd	23 min
a13 (19)	b21 (28)	TCR soluble	Biacore	nd	13 h
a13 (19)	b14 (26)	TCR soluble	Octet	nd	4,1 h
a19 (21)	b14 (26)	TCR soluble	Octet	nd	9,1 h
a7 (17)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	155 pM	5,4 h
a19ka (22)	b1 (25)	ImmTAC	Octet	159 pM	4,5 h
a19ka (22)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	53 pM	16,9 h
a13ka (20)	b21 (28)	ImmTAC ^a	Biacore	58,6 pM	13,8 h
a19ka (22)	b14 (26)	ImmTAC ^b	Biacore	32,3 pM	27,6 h
a19ka (22)	b14L (27)	ImmTAC ^c	Octet	75,1 pM	13,7 h
a13kaLQ (24)	b21L (29)	ImmTAC ^d	Biacore	74 pM	15,6 h

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	Formato (TCR soluble o	Método (Biacore	Parámetros de unión	
a13kaLS (23)	b21L (29)	ImmTAC ^e	Biacore	62,6 pM	8,9 h

(Tabla 9)

nd = no determinado

^a Corresponde a ImmTAC3 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 44 respectivamente. Valores basados en la media de 7 mediciones independientes ^b Corresponde a ImmTAC1 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 42 respectivamente. Valores basados en la media de 7 mediciones independientes ^c Corresponde a ImmTAC2 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 43 respectivamente

^d Corresponde a ImmTAC4 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 45 respectivamente. Valores basados en la media de 4 mediciones independientes

^e Corresponde a ImmTAC5 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 45 respectivamente

Se ensayaron otras combinaciones de regiones variables alfa y beta que contenían mutaciones de la invención con respecto a la unión al complejo GYDGREHTV HLA-A*02. Los datos presentados en la siguiente tabla se obtuvieron usando Biacore, tal como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de dominio variable alfa y beta se prepararon como moléculas ImmTAC.

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	KD	T1/2
a36 (SEQ ID NO: 46)	b21L (SEQ ID NO: 29)	210 pM	9,2 h
a37 (SEQ ID NO: 47)	b21L (SEQ ID NO: 29)	24 pM	47,0 h
a38 (SEQ ID NO 48)	b21 (SEQ ID NO: 29)	233 pM	10,0 h
a39 (SEQ ID NO: 49)	b21 (SEQ ID NO: 29)	3013 pM	0,6 h
a40 (SEQ ID NO: 50)	b21 (SEQ ID NO: 29)	176 pM	4,5 h

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	KD	T1/2
a41 (SEQ ID NO: 51)	b21 (SEQ ID NO: 29)	429 pM	2,7 h
a13ka (SEQ ID NO:)	b41 (SEQ ID NO: 65)	45 pM	25,1 h
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b42 (SEQ ID NO: 66)	424 pM	2,1 h
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b43 (SEQ ID NO: 67)	150 pM	8,0 h
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b44 (SEQ ID NO: 68)	132 pM	9,0 h
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b45 (SEQ ID NO: 69)	704 pM	1,9 h
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b46 (SEQ ID NO: 70)	1913 pM	0,9 h
a30 (SEQ ID NO: 52)	b14 (SEQ ID NO: 26)	103 pM	17 h
a42 (SEQ ID NO: 53)	b14 (SEQ ID NO: 26)	21 pM	46,4 h
a31 (SEQ ID NO: 54)	b14 (SEQ ID NO: 26)	182 pM	9 h
a43 (SEQ ID NO: 55)	b14 (SEQ ID NO: 26)	258 pM	6,0 h
a32 (SEQ ID NO: 56)	b14 (SEQ ID NO: 26)	179 pM	12 h
a44 (SEQ ID NO: 57)	b14 (SEQ ID NO: 26)	88 pM	19,0 h
a33 (SEQ ID NO: 58)	b14 (SEQ ID NO: 26)	947 pM	1,2 h
a45 (SEQ ID NO: 59)	b14 (SEQ ID NO: 26)	74 pM	11,8 h
a34 (SEQ ID NO: 60)	b14 (SEQ ID NO: 26)	167 pM	8,7 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b32 (SEQ ID NO: 71)	37,0 pM	30,9 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b33 (SEQ ID NO: 72)	33 pM	35,9 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b34 (SEQ ID NO: 73)	54 pM	21,2 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b35 (SEQ ID NO: 74)	28 pM	37,4 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b36 (SEQ ID NO: 75)	11 pM	58 h

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	KD	T _{1/2}
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b37 (SEQ ID NO: 76)	47 pM	24,9 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b38 (SEQ ID NO: 77)	597 pM	2,3 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b39 (SEQ ID NO: 78)	923 pM	1,1 h
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b40 (SEQ ID NO: 79)	143 pM	7,9 h
aM50L (SEQ ID NO: 62)	bWT (SEQ ID NO: 5)	31,3 µM	nd
aS95A (SEQ ID NO: 63)	bWT (SEQ ID NO: 5)	3,5 µM	nd
aS98L (SEQ ID NO: 64)	bWT (SEQ ID NO: 5)	39,1 µM	nd
aWTka (SEQ ID NO: 61)	bL96D (SEQ ID NO: 80)	71,4 µM	nd
aWTka (SEQ ID NO: 61)	bM97Q (SEQ ID NO: 81)	27,5 µM	nd

(Tabla 10)

nd - no determinado

Los datos presentados en las tablas 9 y 10 indican que ciertas secuencias variables de TCR de la invención tienen una alta afinidad de unión y una larga semivida para el complejo GVDGREHTV HLA-A*02 y, por lo tanto, son particularmente adecuadas para usarse como reactivos terapéuticos solubles.

Además de la unión al complejo GVDGREHTV HLA-A*02 afín, los TCR de la invención también se evaluaron con respecto a la unión a péptidos similares derivados de MAGE A8 y MAGE B2 y presentados por HLA-A*02. Los números presentados en la siguiente tabla proporcionan datos de unión de Biacore para tres moléculas ImmTAC que comprenden las secuencias de dominio variable alfa y beta indicadas. Las tres moléculas ImmTAC reconocen el péptido de MAGE-A8 a un nivel similar al del péptido afín y el péptido de MAGE-B2 a un nivel más débil.

Cadena alfa (SEQ ID NO)	Cadena beta (SEQ ID NO)	MAGE-A8		MAGE-B2	
		KD	T _{1/2}	KD	T _{1/2}
a19ka (22)	b14 (26) ^a	62,8 pM	17,5 h	468 pM	7,7 h
a13ka (20)	b21 (28) ^b	99,2 pM	8,7 h	847 pM	4,2 h
a13kaLQ (24)	b21L (29) ^c	155 pM	9,6 h	1532 pM	3,27 h

(Tabla 11)

^a Corresponde a ImmTAC1 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 42 respectivamente.

^b Corresponde a ImmTAC3 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 44 respectivamente.

^c Corresponde a ImmTAC4 del ejemplo 6, las secuencias completas de cadena alfa y beta se proporcionan en la SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 45 respectivamente.

Ejemplo 6 - Redirección de células T potente y específica por moléculas ImmTAC

Se ensayaron moléculas ImmTAC que contenían secuencias de cadena variable alfa y beta mutadas con una afinidad particularmente alta por el antígeno diana, con respecto a su capacidad de mediar la redirección potente y específica de células T CD3+ mediante un ensayo ELISPOT, usando la secreción de interferón- γ (IFN- γ) como lectura para la activación de células T.

En este ejemplo, la secuencia de la región variable de cadena alfa se seleccionó entre las SEQ ID NO: 20-24, y la secuencia de la región variable de cadena beta se seleccionó entre las SEQ ID NO: 26-29. Las secuencias de dominio variable se fusionaron a las secuencias de dominio constante extracelular alfa o beta respectivas y contenían un enlace disulfuro no nativo. En todos los casos, la cadena beta se fusionó a través de un enlazador a un scFv anti-CD3; el enlazador se seleccionó entre las SEQ ID NO: 30 - 37. Las secuencias completas de las moléculas ImmTAC ensayadas se proporcionan por las SEQ ID NO expuestas en la siguiente tabla:

	Cadena alfa SEQ ID NO	Cadena beta SEQ ID NO
ImmTAC1	38	42
ImmTAC2	38	43
ImmTAC3	39	44
ImmTAC4	40	45
ImmTAC5	41	45

(Tabla 12)

Método

Se realizaron ensayos usando un kit ELISPOT de IFN- γ humano (BD Biosciences). Se prepararon células diana a una densidad de 1×10^6 /ml en medio de ensayo (RPMI 1640 que contenía FBS inactivado térmicamente al 10 % y penicilina-estreptomicina-L-glutamina al 1 %) y se cultivaron en placas a 50.000 células por pocillo en un volumen de 50 μ l. Como células efectoras se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), aisladas a partir de sangre fresca de donantes, y se cultivaron a 10.000 - 50.000 células por pocillo en un volumen de 50 μ l (el número exacto de células usadas para cada experimento depende del donante y puede ajustarse para producir una respuesta dentro de un intervalo adecuado para el ensayo). Se usaron concentraciones variables de ImmTAC, que incluían el intervalo clínicamente relevante previsto, y se añadieron al pocillo en un volumen de 50 μ l.

Se prepararon placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los pocillos relevantes se añadieron células diana, células efectoras y moléculas ImmTAC y se enrasaron hasta el volumen final de 200 μ l con medio de ensayo. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. También se prepararon pocillos de control con la omisión de ImmTAC, células efectoras o células diana. Después, las placas se incubaron durante una noche (37°C/5 % CO₂). Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (bolsa de PBS1x, que contenía P20 al 0,05 %, preparado en agua desionizada). Después se añadió anticuerpo de detección primario a cada pocillo en un volumen de 50 μ l. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de lavarse de nuevo tres veces. La detección secundaria se realizó añadiendo 50 μ l de estreptavidina diluida-HRP a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora y se repitió la etapa de lavado. No antes de 15 minutos antes del uso, se añadió una gota (20 μ l) de cromógeno AEC por cada 1 ml de sustrato AEC con mezcla y se añadieron 50 μ l a cada pocillo. Se controló regularmente la aparición de puntos y las placas se lavaron en agua corriente para terminar la reacción de revelado. Después, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de contar los puntos usando un analizador de CTL con paquete informático Immunospot (Cellular Technology Limited).

Resultados

Los datos presentados en las Figuras 7 y 8, paneles superiores, muestran que las moléculas ImmTAC 1-2 y 3-5, respectivamente, pueden mediar una potente (es decir, CE_{50} menor de 100 pM) redirección de células T contra células cancerosas que expresan el antígeno diana (NCI-H1703 - línea celular de cáncer de pulmón humano). No se detectó activación de células T contra células cancerosas negativas para el antígeno (línea celular de adenocarcinoma papilar humano NCI-H441 para moléculas ImmTAC 1-2, y línea celular de cáncer de mama humano CAMA-1 para moléculas ImmTAC 3-5), dentro del intervalo de concentraciones clínicas relevantes (≤ 1 nM), lo que demuestra que la respuesta es específica.

Se ensayó la especificidad de las moléculas ImmTAC usando células derivadas de tejidos humanos sanos normales como células diana. El panel inferior de la figura 7 demuestra que las moléculas ImmTAC 1-2 tienen una reactividad mínima a una concentración clínica relevante contra células vasculares de piel humana. De manera similar, Los paneles inferiores de la figura 8 demuestran que las moléculas ImmTAC 3-5 tienen una reactividad mínima a una concentración clínica relevante contra células vasculares de piel humana y células renales humanas.

Las moléculas ImmTAC 1 y 3 se ensayaron adicionalmente con respecto a la especificidad contra un panel de células humanas derivadas de tejidos sanos normales usando la misma metodología ELISPOT descrita anteriormente. Los datos presentados en la figura 9 muestran una activación limitada de células T, dentro de un intervalo de concentraciones clínicamente relevantes (≤ 1 nM), para tejidos sanos entre los que se incluyen el tejido vascular de la piel, cardíaco, esquelético, hepático y pulmonar.

Las moléculas ImmTAC 1 y 4 se ensayaron adicionalmente con respecto a la reactividad frente a un panel extendido de >10 tipos celulares normales, usando la misma metodología ELISPOT descrita anteriormente y con un intervalo más fino de concentraciones de ImmTAC (0,01 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,3 nM, 0,5 nM y 1 nM). La figura 10 muestra datos representativos obtenidos a partir de células esqueléticas, cardíacas y renales. En todos los casos, se

incluyeron como controles células positivas para el antígeno (NCI-H1703) y células negativas para el antígeno (NCI-H441). Los datos demuestran una reactividad despreciable contra las células normales, con respecto a células positivas para el antígeno, dentro de un intervalo de concentraciones clínicamente relevantes (≤ 1 nM).

Estos datos indican que estas moléculas ImmTAC demuestran un alto nivel de potencia y especificidad y, por lo tanto, son particularmente adecuadas para el uso terapéutico.

Ejemplo 7 - Potente destrucción de células tumorales mediante células T redirigidas por ImmTAC

La capacidad de moléculas ImmTAC de la invención de mediar una potente destrucción de células tumorales positivas para el antígeno por células T redirigidas se investigó usando la plataforma IncuCyte (Essen BioScience).

Este ensayo muestra la detección en tiempo real por microscopía de la liberación de Caspasa-3/7, un marcador de la apoptosis.

Método

Se realizaron ensayos usando el kit de ensayo de apoptosis de Caspasa-3/7 de 96 pocillos (Essen BioScience, Cat. N.º 4440) y se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. En resumen, se cultivaron células diana (NCI-H1703 - antígeno⁺ HLA A*02⁺ y NCI-H441 - antígeno⁻ HLA A*02⁺) a 5000 células por pocillo y se incubaron durante una noche para permitir que se adhirieran. Se prepararon soluciones de ImmTAC a concentraciones comprendidas entre 0,5 nM y 0,01 nM, y se añadieron 25 µl de cada concentración al pocillo relevante. Se usaron células efectoras a una relación de efector y célula diana de 10:1 (50000 células por pocillo). También se preparó una muestra de control sin ImmTAC. Se llevó reactivo de ensayo NucView a 30 µM y se añadieron 25 µl a cada pocillo y el volumen final se llevó a 150 µl (obteniéndose una concentración final de 5 µM). La placa se puso en el instrumento IncuCyte y se tomaron imágenes cada 2 horas (1 imagen por pocillo) durante 3 días. Se determinó el número de células apoptóticas en cada imagen y se registró como células apoptóticas por mm². Los ensayos se efectuaron por triplicado.

Resultados

Los datos presentados en la figura 11 muestran la destrucción en tiempo real de células tumorales por células T redirigidas por ImmTAC. Se presentan resultados para ImmTAC1 y ImmTAC4. Las dos moléculas ImmTAC muestran la destrucción por células T redirigidas de células tumorales positivas para el antígeno a una concentración de 0,01 nM. No se observa destrucción de células negativas para el antígeno incluso a la máxima concentración (0,5 nM).

Estos datos confirman que ImmTAC1 e ImmTAC4 median una potente destrucción por células T redirigidas de células tumorales positivas para el antígeno.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.