

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3440105

DAL TITOLO:

"RECETTORI DI CELLULE T"

*** **

DESCRIZIONE

La presente invenzione di riferisce a recettori di cellule T (TCR) che legano il peptide HLA-A*02 ristretto GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) derivato dall'antigene di cancro germinale MAGE A4. Detti TCR comprendono mutazioni non naturali all'interno dei domini variabili alfa e/o beta rispetto ad un TCR di MAGE A4 nativo. I TCR dell'invenzione sono particolarmente adeguati per un uso come nuovi reagenti immunoterapeutici per il trattamento di una malattia maligna. Qualsiasi riferimento a metodi per un trattamento del corpo umano animale mediante intervento chirurgico o terapia devono essere interpretati come riferimenti ai composti, alle composizioni farmaceutiche e ai medicamenti della presente invenzione per un uso in un metodo per un trattamento.

Stato dell'arte dell'invenzione

I recettori di cellule T (TCR) sono espressi naturalmente da cellule T CD4⁺ e CD8⁺. I TCR sono disegnati per riconoscere brevi antigeni peptidici che sono presentati sulla superficie di cellule presentanti un antigene in complesso con le molecole del complesso di istocompatibilità maggiore (MHC) (nell'uomo, le molecole di MHC sono anche conosciute come antigeni leucocitari umano, o HLA) (Davis, et al., (1998), Annu Rev Immunol 16: 523-544.). Le cellule T CD8⁺, che sono anche chiamate cellule T citotossiche, riconoscono specificatamente i

peptidi legati all'MHC di classe I e sono generalmente responsabili per la ricerca e la mediazione della distruzione di cellule malate. Le cellule T CD8⁺ sono in grado di distruggere cellule cancerose così come infettate da virus; tuttavia, l'affinità di TCR espressi da cellule T specifiche per cancro nel repertorio naturale è tipicamente bassa come risultato della selezione timica, il che significa che le cellule cancerose spesso sfuggono al rilevamento e alla distruzione. Nuovi approcci immunoterapeutici volti a promuovere il riconoscimento del cancro da parte di cellule T offrono una strategia molto promettente per lo sviluppo di trattamenti antitumorali efficaci.

MAGE A4 appartiene alla famiglia di MAGE degli antigeni di cancro codificati nella linea germinale (De Plaen, et al., (1994), *Immunogenetics* 40(5): 360-369) e ha il numero di accesso Uniprot P43358. Tali antigeni sono stati riscontrati essere frequentemente espressi in una varietà di cancri, mentre la loro espressione in tessuti normali è limitata a test su adulti e ad altri siti immuno-privilegiati, inclusa la placenta. La natura specifica per cancro di questi geni li rende bersagli ideali per le terapie antitumorali. La funzione precisa di MAGE A4 rimane sconosciuta ma viene ritenuto che svolga un ruolo nello sviluppo embrionale. Un'espressione di alto livello di MAGE A4 è stata riportata in tumori di diversi tipi inclusi melanoma, carcinomi dell'esofago, della testa e del collo, del polmone, della mammella e della vescica (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). Il peptide 10-mero GVYDGREHTV (SEQ ID NO 1) corrisponde ad amminoacidi 230-239 della proteina di MAGE A4 di lunghezza intera. Questo peptide si lega a HLA-A*02 e il complesso di peptide-HLA è stato mostrato stimolare cellule T citotossiche portando a lisi di cellule tumorali positive per MAGE A4, positive per HLA-A*02 (Duffour, et al., (1999), Eur J Immunol 29(10): 3329-3337 e WO2000020445). Il complesso di GVYDGREHTV HLA-A*02 di conseguenza fornisce un antigene bersaglio utile per un intervento immunoterapeutico.

L'identificazione di particolari sequenze di TCR che si legano al complesso di GVYDGREHTV HLA-A*02 con elevata specificità è vantaggiosa per lo sviluppo di nuove immunoterapie. I TCR terapeutici possono essere utilizzati, ad esempio, come agenti di bersagliamento solubili allo scopo di erogare agenti citotossici o immuno effettori al tumore (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 in alternativa possono essere usati per ingegnerizzare cellule T per una terapia adottiva (June, et al., (2014), Cancer Immunol Immunother 63(9): 969-975). Tuttavia, tali sequenze di TCR non sono note nell'arte, e i metodi per l'identificazione di TCR con caratteristiche di specificità suscettibili ad uso terapeutico hanno un alto tasso di abbandono e quindi non forniscono al tecnico competente una ragionevole aspettativa di

successo.

In primo luogo, il tecnico competente deve identificare una sequenza di partenza o di impalcatura adatta. Tipicamente tali sequenze sono ottenute da fonti naturali ad esempio da cellule T rispondenti all'antigene estratte da sangue di donatore. Data la rarità di cellule T specifiche per cancro nel repertorio naturale, è spesso necessario effettuare uno screening di molti donatori, ad esempio 20 o più, prima che possa essere trovata una cellula T che risponde. Il processo di screening può richiedere diverse settimane o mesi e, anche se viene trovata una cellula T che risponde, essa può non essere adatta per l'uso immunoterapeutico. Ad esempio, la risposta può essere troppo debole e/o può non essere specifica per l'antigene bersaglio, in alternativa può non essere possibile generare una popolazione di cellule T clonali, né espandere o mantenere una data linea di cellule T per produrre materiale sufficiente per identificare le sequenze di catene di TCR corrette. In aggiunta, poiché i TCR sono degenerati e sono stati predetti essere in grado di legare approssimativamente un milione di differenti peptidi di HLA (Wooldridge, et al., (2012), J Biol Chem 287(2): 1168-1177)) è eccezionalmente difficile anche per professionisti esperti essere in grado di determinare se un particolare TCR ha un profilo di specificità che lo renderebbe idoneo all'ingegnerizzazione per uso terapeutico.

Le sequenze di TCR che sono adatte come sequenze di partenza o impalcatura dovrebbero avere una buona affinità per il complesso di peptide bersaglio-HLA, ad esempio 200 μ M o più forte, dimostrare un alto livello di specificità di bersaglio, ad esempio legame

relativamente debole o nullo con complessi alternativi di peptide-HLA, essere modificabili per l'uso in librerie di visualizzazione, come la visualizzazione su fagi, ed essere in grado di essere ripiegate e purificate con una resa elevata.

I TCR così come esistono in natura hanno una debole affinità per l'antigene bersaglio (basso intervallo micromolare) rispetto agli anticorpi, e i TCR contro gli antigeni di cancro hanno tipicamente un riconoscimento dell'antigene più debole rispetto ai TCR specifici virali (Aleksic, et al. (2012). *Eu J Immunol.*, 42(12), 3174-3179). Questa debole affinità unita alla sotto-regolazione di HLA su cellule di cancro significa che i TCR terapeutici per l'immunoterapia di cancro richiedono l'ingegnerizzazione per aumentare la loro affinità per l'antigene bersaglio e quindi generare una risposta più potente. Le affinità di legame dell'antigene di TCR nell'intervallo da nanomolare a picomolare, con emivite di legame di diverse ore, sono desiderabili per agenti di bersagliamento a base di TCR solubili. La potenza migliorata generata dal riconoscimento di antigene ad alta affinità a bassi numeri di epitopi è esemplificata nelle Figure 1e e 1f di Liddy et al. (Liddy, *et al.* (2012), *Nat Med*, 18(6), 980-987). La maturazione per affinità implica tipicamente che il tecnico competente debba identificare specifiche mutazioni e/o combinazioni di mutazioni, incluse ma non limitate a sostituzioni, inserzioni e/o delezioni, che possono essere apportate alla sequenza di TCR di partenza al fine di aumentare la forza del riconoscimento dell'antigene. Nell'arte sono noti metodi per identificare mutazioni di un dato TCR che conferiscono una intensificazione di affinità, ad esempio

l'uso di librerie di visualizzazione (Li et al., (2005) Nat Biotechnol. 23(3):349-354; Holler et al., (2000). Proc Natl Acad Sci U S A; 97(10):5387-5392). Tuttavia, per produrre aumenti significativi dell'affinità di un dato TCR contro un dato bersaglio richiede che il tecnico competente selezioni specifiche mutazioni e/o combinazioni di mutazioni da un ampio pool di possibili alternative. Le specifiche mutazioni e/o combinazioni di mutazioni che producono aumenti significativi dell'affinità non sono prevedibili e c'è un alto tasso di abbandono. In molti casi può non essere possibile ottenere incrementi significativi dell'affinità con una data sequenza di TCR di partenza.

Il processo di maturazione per affinità deve anche tenere conto della necessità di mantenere una specificità di antigene di TCR. L'aumento dell'affinità di un TCR per il suo antigene bersaglio comporta un rischio sostanziale di rivelare una reattività crociata con altri bersagli non intenzionali come risultato della degenerazione intrinseca del riconoscimento di antigene di 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 livello di affinità naturale, il riconoscimento dell'antigene a reattività incrociata può essere troppo basso per produrre una risposta. Se un antigene a reattività incrociata viene visualizzato su cellule sane normali, esiste una forte possibilità di legame fuori bersaglio *in vivo* che può manifestarsi in una tossicità clinica. Pertanto, oltre ad aumentare la forza di legame dell'antigene, il tecnico competente deve anche selezionare mutazioni e o combinazioni di mutazioni che consentono al TCR di

mantenere un'elevata specificità per l'antigene bersaglio e dimostrare un buon profilo di sicurezza in test preclinici. Anche in questo caso tali mutazioni e/o combinazioni di mutazioni non sono prevedibili. Il tasso di abbandono in questo stadio è ancora più alto e in molti casi non può essere affatto realizzabile da una data sequenza di TCR di partenza.

Le mutazioni richieste per un'elevata affinità e un'elevata specificità dovrebbero anche produrre un TCR che è in grado di essere espresso, ripiegato e purificato con una resa ragionevole e che è altamente stabile in una forma purificata.

Nonostante le difficoltà descritte sopra nell'identificare sequenze di TCR con caratteristiche idonee per un uso terapeutico, gli inventori hanno sorprendentemente trovato una sequenza di TCR che fornisce un punto di partenza, o impalcatura ideale per produrre TCR terapeutici. Inoltre, gli inventori hanno identificato inaspettatamente mutazioni adatte che possono essere introdotte nei domini variabili alfa e beta dell'impalcatura per produrre sequenze di TCR con caratteristiche ideali per l'immunoterapia mirata basata su TCR di cancro che esprimono MAGE A4.

Sommario dell'invenzione

In un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un recettore di cellule T (TCR) avente la proprietà di legarsi a GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) in complesso con HLA-A*02 e comprendente un dominio variabile di catena alfa di TCR e un dominio variabile di catena beta di TCR,

(a) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(b) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 25;

(c) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(d) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(e) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(f) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27;

(g) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(h) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(i) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 46; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(j) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 47; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(k) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 48; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(l) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(m) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 50; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 29;

(n) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 51; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(o) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 65;

(p) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 66;

(q) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 67;

(r) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 68;

(s) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 69;

(t) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 70;

(u) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 52; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(v) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 53; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(w) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 54; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(x) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 55; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(y) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 56; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(z) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 57; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(aa) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 58; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(bb) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 59; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(cc) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 60; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(dd) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 71;

(ee) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 72;

(ff) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 73;

(gg) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 74;

(hh) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 75;

(ii) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76;

(jj) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77;

(kk) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78; o

(ll) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 79.

Caratteristiche preferite degli aspetti dell'invenzione sono esposte nelle rivendicazioni dipendenti nel presente documento.

Qui viene divulgato un TCR che si lega a un complesso di GYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 con affinità maggiore di 200 μ M, in cui: le CDR di catena alfa 1, 2 e 3 comprendono rispettivamente le SEQ ID NO 6, 7 e 8 e/o le CDR di catena beta 1, 2 e 3 comprendono le SEQ ID NO 11, 12 e 13 rispettivamente; e/o almeno una delle CDR contiene una o più sostituzioni conservative rispetto a SEQ ID NO: da 6 a 8 e da 11 a 13; e/o almeno una delle CDR contiene fino a tre sostituzioni tollerate rispetto a SEQ ID NO: da 6 a 8 e da 11 a 13.

L'affinità dei TCR dell'invenzione per il complesso di GYDGREHTV HLA-A*02 può essere compresa nell'intervallo tra 200 μ M e 1 pM. Preferibilmente dette sostituzioni non cambiano l'affinità di legame di più di +/- 50%, o più preferibilmente di non più di +/- 20%, rispetto al TCR non sostituito. Preferibilmente dette sostituzioni non aumentano l'affinità di legame per complessi alternativi di peptide-HLA.

L'impalcatura di TCR ha il seguente utilizzo di catena variabile alfa e beta:

Catena alfa: TRAV10*01/TRAJ6*01

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

(Nota, il termine '*01' indica la variante allelica per questa sequenza, come indicato dalla nomenclatura IMGT)

e le seguenti sequenze di CDR3 di catena alfa e beta:

Catena alfa: WNHSGGSYIPTF (SEQ ID NO: 8)

Catena beta: ASSFLMTSGDPYEQYF (SEQ ID NO: 13)

Il termine 'TCR di impalcatura' o 'TCR di partenza' viene usato come sinonimo in questa domanda con i termini 'TCR di tipo selvatico' o 'TCR WT' o 'TCR non mutato' o 'TCR nativo', o 'TCR parentale' per indicare un TCR avente una variabile di catena alfa comprendente i residui 1-113 di SEQ ID NO: 2 e un dominio variabile di catena beta comprendente i residui 1-116 di SEQ ID NO: 3. Il dominio costante del TCR WT può essere a lunghezza intera o può essere troncato e/o mutato per produrre un TCR solubile. In entrambi i casi le sostituzioni di cisteina possono essere introdotte nelle regioni di TRAC e TRBC in modo tale che un legame disolfuro intercatena non nativo possa essere formato. Posizioni adatte per la localizzazione di dette sostituzioni di cisteina sono descritte in WO03020763. La figura 2 dei disegni allegati mostra le sequenze extracellulari rispettivamente delle catene alfa e beta di TCR di tipo selvatico, in formato solubile. SEQ ID NO: 4 è identica alla sequenza extracellulare di catena alfa nativa SEQ ID NO: 2 tranne per il fatto che la cisteina nella posizione 48 del dominio costante è stata sostituita con treonina. Allo stesso modo SEQ ID NO: 5 è identico alla sequenza extracellulare di catena beta nativa SEQ ID NO: 3 eccetto che la cisteina nella posizione 57 del dominio costante è stata sostituita con serina, la cisteina nella posizione 75 del dominio costante è stata sostituita con alanina e l'asparagina nella posizione 89 del dominio costante è stata sostituita con acido aspartico. Il TCR solubile di tipo selvatico può essere utilizzato per fornire un riferimento contro cui il profilo di legame di TCR mutati dell'invenzione può essere confrontato.

Le sequenze di TCR qui definite sono descritte con riferimento alla nomenclatura IMGT che è ampiamente nota ed accessibile a chi opera nel campo di TCR. Ad esempio, vedere: LeFranc e 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: Appendice 100; e Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266. Brevemente, TCR $\alpha\beta$ consistono in due catene collegate da disolfuro. Ogni catena (alfa e beta) è generalmente considerata come dotata di due domini, vale a dire un dominio variabile e uno costante. Una breve regione di giunzione collega il dominio variabile e quello costante ed è tipicamente considerata parte della regione variabile alfa. Inoltre, la catena beta di solito contiene una breve regione di diversità accanto alla regione di giunzione, che è anche tipicamente considerata parte della regione variabile beta.

Il dominio variabile di ciascuna catena è situato N-terminalmente e comprende tre Regioni di determinazione della complementarietà (CDR) incorporate in una sequenza di cornice. Le CDR comprendono il sito di riconoscimento per il legame peptide-MHC. Ci sono diversi geni che codificano per regioni variabili di catena alfa ($V\alpha$) e diversi geni che codificano per regioni variabili di catena beta ($V\beta$), che sono distinti per le loro sequenze di cornice, CDR1 e CDR2 e per una sequenza di CDR3 parzialmente definita. I geni di $V\alpha$ e $V\beta$ sono riferiti nella nomenclatura IMGT rispettivamente con il prefisso TRAV e TRBV (Folch e Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner e Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc e LeFranc, (2001), "T cell

Receptor Factsbook", Academic Press). Allo stesso modo ci sono diversi geni di unione o J, chiamati TRAJ o TRBJ, rispettivamente per la catena alfa e beta, e per la catena beta, un gene diversità o D chiamato TRBD (Folch e Lefranc, (2000), *Exp Clin Immunogenet* 17(2): 107-114; Scaviner e Lefranc, (2000), *Exp Clin Immunogenet* 17(2): 97-106; LeFranc e LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). L'enorme diversità di catene di recettore di cellule T deriva da riarrangiamenti combinatori tra i vari geni V, J e D, che includono varianti alleliche, e diversità giunzionale (Arstila, et al., (1999), *Science* 286(5441): 958-961; Robins et al., (2009), *Blood* 114(19): 4099-4107.) Le regioni costanti, o C, di catene di TCR alfa e beta sono riferite rispettivamente TRAC e TRBC (Lefranc, (2001), *Curr Protoc Immunol* Appendix 1: Appendice 1O).

Il dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26; il dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27; il dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28; il dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29; il

dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29.

Il TCR dell'invenzione può essere un eterodimero alfa-beta, avente una sequenza di dominio costante TRAC di catena alfa e una sequenza di dominio costante TRBC1 o TRBC2 di catena beta.

Il TCR dell'invenzione può essere in formato a catena singola che include ma non è limitato a $V\alpha$, $-L-V\beta$, $V\beta-L-V\alpha$, $V\alpha-C\alpha-L-V\beta$, $V\alpha-L-V\beta-C\beta$, $V\alpha-C\alpha-L-V\beta-C\beta$, in cui $V\alpha$ e $V\beta$ sono rispettivamente regioni variabili di TCR α e β , $C\alpha$ e $C\beta$ sono regioni costanti di TCR α e β rispettivamente e L è una sequenza di linker.

Il TCR dell'invenzione può essere associato a un'etichetta rilevabile, un agente terapeutico o una frazione funzionale modificante la PK.

Il TCR dell'invenzione può comprendere un anticorpo anti-CD3 collegato in modo covalente al C- o N-terminale della catena alfa o beta del TCR. La catena beta può essere collegata alla sequenza di anticorpo anti-CD3 tramite una sequenza di linker; la sequenza di linker può essere selezionata dal gruppo costituito da 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), e GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37).

In un secondo aspetto, la presente invenzione fornisce una molecola di fusione TCR-anti-CD3 in cui:

(a) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(b) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 25;

(c) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(d) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(e) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(f) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27;

(g) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(h) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(i) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 46; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(j) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 47; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(k) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 48; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(l) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(m) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 50; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 29;

(n) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 51; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(o) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 65;

(p) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 66;

(q) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 67;

(r) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 68;

(s) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 69;

(t) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 70;

(u) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 52; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(v) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 53; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(w) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 54; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(x) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 55; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(y) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 56; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(z) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 57; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(aa) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 58; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(bb) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 59; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(cc) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 60; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(dd) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 71;

(ee) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 72;

(ff) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 73;

(gg) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 74;

(hh) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 75;

(ii) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76;

(jj) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77;

(kk) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78; o

(ll) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 79, e

in cui l'anticorpo anti-CD3 è collegato in modo covalente all'N-terminale o C-terminale della catena beta di TCR tramite una sequenza di linker selezionata da SEQ ID NO: 30-37.

Il TCR dell'invenzione può essere incluso in una libreria di particelle. Per tali scopi il TCR può essere visualizzato sulla superficie di un batteriofago, una cellula di lievito, una cellula di mammifero o un ribosoma, per esempio. Il TCR può essere isolato, privo di cellule e/o solubile, ovvero potrebbe non essere un TCR che si presenta nel suo stato naturale all'interno di una cellula T all'interno di un corpo umano.

I TCR dell'invenzione possono essere non presenti in natura e/o purificati e/o ingegnerizzati.

Qui vengono divulgati TCR che possono avere più di una mutazione presente nel dominio variabile di catena alfa e/o nel dominio variabile di catena beta rispetto al TCR di MAGE A4 nativo. Il dominio variabile di catena alfa può avere una mutazione in almeno una delle seguenti posizioni con riferimento alla numerazione di residui 1-113 di SEQ ID NO: 2: M50, T51, F52, S53, E54, H94, S95, G96, S98. Le mutazioni possono essere selezionate dai seguenti amminoacidi con riferimento alla numerazione di residui 1-113 di SEQ ID NO: 2:

(Tabella 1)

Residuo n.	
M50	L
T51	D

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

In aggiunta o in alternativa, il dominio variabile di catena beta può avere una mutazione in almeno una delle seguenti posizioni con riferimento alla numerazione di residui 1-116 di SEQ ID NO: 3: M27; D28; H29, E30, N31, Y50, D51, V52, K53, M54, F95, L96, M97, T98. Le mutazioni possono essere selezionate dai seguenti amminoacidi con riferimento alla numerazione di residui 1-116 di SEQ ID NO: 3:

(Tabella 2)

Residuo n.	
M27	A, L
D28	P
H29	L
E30	S
N31	K

Residuo n.	
Y50	R
D51	F
V52	A
K53	T
M54	G, L
F95	S
L96	D
M97	Q
T98	N

Il dominio variabile di catena alfa può avere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 delle mutazioni mostrate nella Tabella 1 e/o il dominio variabile di catena beta può avere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 delle mutazioni mostrate nella Tabella 2.

Il dominio variabile di catena alfa può avere almeno uno dei seguenti gruppi di mutazioni:

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

Gruppo 2: H94S, S95A, G96N, S98L

Gruppo 3: H94R S95A, G96D, S98L

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

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

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

e/o il dominio variabile di catena beta può avere almeno uno dei seguenti gruppi di mutazioni:

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

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

Gruppo 3: F95S, L96D, M97Q, T98N

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

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

Per esempio, il dominio variabile di catena alfa può avere mutazioni di Gruppo 4 e il dominio variabile di catena beta può avere mutazioni di Gruppo 1; il dominio variabile di catena alfa può avere mutazioni di Gruppo 4 e il dominio variabile di catena beta può avere mutazioni di Gruppo 5; il dominio variabile di catena alfa può avere mutazioni di Gruppo 2 e il dominio variabile di catena beta può avere mutazioni di Gruppo 2; il dominio variabile di catena alfa può avere mutazioni di Gruppo 6 e il dominio variabile di catena beta può avere mutazioni di Gruppo 4; il dominio variabile di catena alfa può avere mutazioni di Gruppo 5 e il dominio variabile di catena beta può avere mutazioni di Gruppo 4.

Le mutazioni possono essere apportate in aggiunta o in alternativa al di fuori delle CDR; tali mutazioni possono migliorare il

legame e/o la specificità e/o la stabilità e/o la resa di una forma solubile purificata del TCR. Ad esempio, il TCR può comprendere in aggiunta o in alternativa un dominio variabile di catena alfa che ha le seguenti mutazioni con riferimento alla numerazione di residui 1-113 di SEQ ID NO: 2:

(Tabella 3)

Residuo n.	
K1	A
C19	V

Nel dominio variabile di catena alfa la sequenza di residui amminoacidici 27 - 32, 50 - 56 e 91 -103 può essere selezionata tra le seguenti:

(Tabella 4)

Residui 27 - 32 (CDR1)	Residui 50 - 56 (CRD2)	Residui 91 - 103 (CDR3)
VSPFSN	MTFSENT	WNHSGGSYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	WNSANGLYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	WNRADGLYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	WNHSGGSYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	WNSASGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	WNSAQGLYIPTF

Il dominio variabile di catena alfa di TCR può comprendere una sequenza amminoacidica che ha almeno il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità rispetto a una qualsiasi delle SEQ ID NO: 16 - 24 o 46 - 64.

Nel dominio variabile di catena beta la sequenza di residui amminoacidici 27 - 31, 49 - 54 e 92 - 107 può essere selezionata tra le seguenti:

(Tabella 5)

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

Il dominio variabile di catena beta di TCR può comprendere una sequenza amminoacidica che ha almeno il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità rispetto a una qualsiasi delle SEQ ID NO: 25 - 29 o 65 - 81.

La sequenza di dominio variabile di catena alfa di residui amminoacidici 27-32, 50-56 e 91-103 e la sequenza di dominio variabile

di catena beta di residui amminoacidici 27-31, 49-54 e 92-107 possono essere selezionate tra le seguenti

(Tabella 6)

Catena alfa			Catena beta		
27-32	50-56	91,103	27-31	49-54	92-107
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	MTFSENT	WNSANGLYIPTF	MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSAQGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSASGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF

Il dominio variabile di catena alfa può comprendere la sequenza amminoacidica di una qualsiasi di SEQ ID NO: da 16 a 24 o 46 - 64 e il dominio variabile di catena beta può comprendere la sequenza amminoacidica di una qualsiasi di SEQ ID NO: da 25 a 29 o 65 - 81.

Il TCR può comprendere una regione di cornice di catena alfa 2 (FR2) e una regione di cornice di catena alfa 3 (FR3), in cui le regioni FR2 e FR3 comprendono SEQ ID NO: 9 e 10 rispettivamente, e/o contengono una o più, ad esempio una, due o tre, sostituzioni conservative e/o fino a tre sostituzioni tollerate. Il TCR può comprendere una regione FR2 di catena beta e una regione FR3 di catena beta, in cui le regioni FR2 e FR3 comprendono SEQ ID NO: 14 e 15 rispettivamente, e/o contenere una o più, ad esempio una, due o tre, sostituzioni

conservative e/o fino a tre sostituzioni tollerate. Il TCR può comprendere amminoacidi 1-113 di SEQ ID NO: 2 e/o amminoacidi 1-116 di SEQ ID NO: 3, che possono contenere ciascuna una o più sostituzioni conservative e/o fino a tre mutazioni tollerate e/o una o più delle mutazioni riportate nelle tabelle 1, 2 e 3.

"TCR ingegnerizzato" e "TCR mutante" sono usati qui come sinonimi per indicare un TCR che ha una o più mutazioni introdotte rispetto al TCR di MAGE A4 nativo, in particolare nel dominio variabile di catena alfa e/o nel dominio variabile di catena beta dello stesso. L'una o più mutazioni tipicamente migliorano l'affinità di legame del TCR al complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02, ma possono conferire in aggiunta o in alternativa altri vantaggi come una migliore stabilità in una forma isolata e una migliore specificità. Le mutazioni in una o più posizioni possono influenzare in aggiunta o in alternativa l'interazione di una posizione adiacente con il complesso di pMHC affine, ad esempio consentendo un angolo più favorevole per l'interazione. Per migliorare il legame del TCR al complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02, le mutazioni sono preferibilmente apportate all'interno di una o più delle regioni CDR.

Ci possono essere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 mutazioni nelle CDR di catena alfa, ad esempio 4, 5 o 9 mutazioni, e/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutazioni nelle CDR di catena beta, ad esempio 4, 9 o 10 mutazioni.

Il dominio variabile di catena α di un TCR qui divulgato può comprendere una sequenza amminoacidica che ha almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il

95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità rispetto alla sequenza di residui amminoacidici 1-113 di SEQ ID NO: 2, a condizione che il dominio variabile di catena α presenti almeno una delle mutazioni delineate sopra, ad esempio nella Tabella 1 o nella Tabella 3. In alcune forme di realizzazione, Il dominio variabile di catena β del TCR dell'invenzione può comprendere una sequenza amminoacidica che ha almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità rispetto alla sequenza di residui amminoacidici 1-116 di SEQ ID NO: 3, a condizione che il dominio variabile di catena β presenti almeno una delle mutazioni delineate sopra, ad esempio nella Tabella 2.

Le mutazioni a un TCR parentale (o di tipo selvatico) possono includere quelle che sono in grado di aumentare l'affinità di legame (k_D e/o emivita di legame) del TCR a GVDGREHTV. Le mutazioni possono includere quelle che sono in grado di ridurre la quantità di legame non specifico, cioè ridurre il legame ad antigeni oltre al legame a GVDGREHTV. Le mutazioni possono includere quelle che aumentano l'efficacia di ripiegamento e/o produzione. Alcune mutazioni possono contribuire a ciascuna di queste caratteristiche, altre possono contribuire all'affinità ma non alla specificità, per esempio, o alla specificità ma non all'affinità, eccetera.

Sono qui divulgate varianti fenotipicamente silenti di qualsiasi TCR dell'invenzione. Come qui utilizzato, il termine "varianti fenotipicamente silenti" è inteso riferirsi a un TCR che incorpora uno o

più ulteriori cambiamenti amminoacidici, incluse sostituzioni, inserzioni e delezioni, oltre a quelli sopra indicati, il cui TCR ha un fenotipo simile al corrispondente TCR senza detto uno o più cambiamenti. Ai fini di questa domanda, il fenotipo di TCR comprende affinità di legame di antigene (K_D e/o emivita di legame) e specificità di antigene. Una variante fenotipicamente silente può avere una K_D e/o emivita di legame per complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 entro il 50%, o più preferibilmente entro il 20%, della K_D e/o emivita di legame misurata del corrispondente TCR senza detto uno o più cambiamenti, quando misurata in condizioni identiche (ad esempio a 25 °C e/o sullo stesso chip di SPR). Condizioni adatte sono ulteriormente fornite nell'Esempio 3. La specificità di un antigene è ulteriormente definita di seguito. Come è noto ai tecnici del ramo, può essere possibile produrre TCR che incorporano cambiamenti nei loro domini variabili rispetto a quelli dettagliati sopra senza alterare l'affinità dell'interazione con il complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02. In particolare, tali mutazioni silenziose possono essere incorporate all'interno di parti della sequenza che sono note per non essere direttamente coinvolte nel legame di antigene (ad esempio le CDR o parti delle CDR che non entrano in contatto con l'antigene peptidico).

Le varianti fenotipicamente silenziose possono contenere una o più sostituzioni conservative e/o una o più sostituzioni tollerate. Sostituzioni tollerate e conservative possono dare come risultato un cambiamento della K_D e/o dell'emivita di legame per complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 entro il 50%, o più preferibilmente entro il 20%,

ancor più preferibile entro il 10%, della K_D e/o dell'emivita di legame misurata del corrispondente TCR senza detta una o più sostituzioni conservative e/o tollerate, quando misurate in condizioni identiche (ad esempio a 25 °C e/o lo stesso chip di SPR), a condizione che il cambiamento di K_D non dia come risultato un'affinità che è inferiore (cioè più debole di) 200 μ m. Per sostituzioni tollerate vengono intese quelle sostituzioni che non rientrano nella definizione di conservative di seguito come fornito di seguito ma sono comunque fenotipicamente silenti.

I TCR possono includere una o più sostituzioni conservative che hanno una sequenza amminoacidica simile e/o che mantengono la stessa funzione (cioè sono fenotipicamente silenziose come definito sopra). Il tecnico competente è consapevole che svariati amminoacidi hanno proprietà simili e quindi sono "conservativi". Uno o più di tali amminoacidi di una proteina, un polipeptide o un peptide possono spesso essere sostituiti da uno o più altri di tali amminoacidi senza eliminare un'attività desiderata di quella proteina, quel polipeptide o quel peptide.

Così gli amminoacidi glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina possono essere spesso sostituiti l'uno con l'altro (aminoacidi aventi catene laterali alifatiche). Di queste possibili sostituzioni viene preferito che glicina e alanina vengano usate per sostituire a vicenda (poiché hanno catene laterali relativamente corte) e che valina, leucina e isoleucina si sostituiscano a vicenda (poiché hanno catene laterali alifatiche più grandi che sono idrofobiche). Altri amminoacidi che possono essere spesso sostituiti l'uno con l'altro includono: fenilalanina, tirosina e triptofano (amminoacidi aventi catene laterali aromatiche);

lisina, arginina e istidina (amminoacidi aventi catene laterali basiche); aspartato e glutammato (amminoacidi aventi catene laterali acide); asparagina e glutammina (amminoacidi aventi catene laterali ammidiche); e cisteina e metionina (amminoacidi aventi catene laterali contenenti zolfo). Dovrebbe essere compreso che sostituzioni amminoacidiche possono essere apportate utilizzando amminoacidi presenti in natura o non presenti in natura. Ad esempio, qui viene contemplato che il gruppo metile su un'alanina può essere sostituito con un gruppo etile, e/o che possono essere apportati cambiamenti minori allo scheletro peptidico. Indipendentemente dal fatto che vengano utilizzati o meno amminoacidi naturali o sintetici, è preferibile che siano presenti solamente L-amminoacidi.

Sostituzioni di questa natura sono spesso riferite come sostituzioni amminoacidiche "conservative" o "semi-conservative". Nel presente documento è divulgato un TCR comprendente una sequenza amminoacidica sopra descritta ma con una o più sostituzioni conservative e o una o più sostituzioni tollerate nella sequenza, in modo tale che la sequenza amminoacidica del TCR abbia almeno il 90% di identità, come il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità rispetto al TCR comprendente gli amminoacidi 1-113 di SEQ ID NO: 2, 16-24 o 46 - 64 e/o amminoacidi 1-116 di SEQ ID NO: 3, 25-29 o 65-81.

"Identità" come noto nell'arte è la relazione tra due o più sequenze polipeptidiche o due o più sequenze polinucleotidiche, come determinato confrontando le sequenze. Nell'arte, identità significa anche

il grado di correlazione di sequenza tra sequenze polipeptidiche o polinucleotidiche, a seconda dei casi, come determinato dalla corrispondenza tra stringhe di tali sequenze. Sebbene esistano un numero di metodi per misurare l'identità tra due polipeptidi o due sequenze polinucleotidiche, i metodi comunemente impiegati per determinare l'identità sono codificati in programmi informatici. I programmi informatici preferiti per determinare l'identità tra due sequenze includono, ma non sono limitati a, il pacchetto di programmi GCG (Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN, e FASTA (Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215, 403 (1990)).

Si può usare un programma come il programma CLUTAL per confrontare le sequenze amminoacidiche. Questo programma confronta le sequenze amminoacidiche e trova l'allineamento ottimale inserendo spazi in una delle due sequenze come appropriato. È possibile calcolare l'identità o la similarità amminoacidica (identità più conservazione del tipo di amminoacido) per un allineamento ottimale. Un programma come BLASTx allineerà il tratto più lungo di sequenze simili e assegnerà un valore all'adattamento. È così possibile ottenere un confronto dove sono trovate svariate regioni di similarità, ciascuna avendo un punteggio differente. Entrambi i tipi di analisi di identità sono contemplati nella presente invenzione.

L'identità percentuale di due sequenze amminoacidiche o di due sequenze di acido nucleico viene determinata allineando le sequenze per scopi di confronto ottimale (ad esempio, possono essere introdotte lacune nella prima sequenza per un migliore allineamento con la

sequenza) e confrontando i residui amminoacidici o i nucleotidi in posizioni corrispondenti. Il "miglior allineamento" è un allineamento di due sequenze che dà come risultato la più alta percentuale di identità. La percentuale di identità viene determinata dal numero di residui amminoacidici o nucleotidi identici nelle sequenze che vengono confrontate (cioè, % di identità = numero di posizioni identiche/numero totale di posizioni × 100).

La determinazione della percentuale di identità tra due sequenze può essere realizzata utilizzando un algoritmo matematico noto ai tecnici del ramo. Un esempio di un algoritmo matematico per confrontare due sequenze è l'algoritmo di Karlin e Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificato come in Karlin e Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. I programmi NBLAST e XBLAST di Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 hanno incorporato un tale algoritmo. Le ricerche di nucleotidi di BLAST possono essere eseguite con il programma NBLAST, punteggio = 100, lunghezza di parola = 12 per ottenere sequenze nucleotidiche omologhe a molecole di acido nucleico. Le ricerche di proteine di BLAST possono essere eseguite con il programma XBLAST, punteggio = 50, lunghezza di parola = 3 per ottenere sequenze amminoacidiche omologhe a molecole proteiche per l'uso nell'invenzione. Per ottenere allineamenti con lacune a scopo di confronto, Gapped BLAST può essere utilizzato come descritto in Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. In alternativa, PSI-Blast può essere utilizzato per eseguire una ricerca iterata che rileva relazioni distanti tra molecole (Id.). Quando si utilizzano i programmi

BLAST, Gapped BLAST e PSI-Blast, possono essere utilizzati parametri predefiniti dei rispettivi programmi (ad esempio XBLAST e NBLAST). Vedere <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Un altro esempio di un algoritmo matematico utilizzato per il confronto di sequenze è l'algoritmo di Myers e Miller, CABIOS (1989). Il programma ALIGN (versione 2.0), che fa parte del pacchetto software di allineamento di sequenza CGC, ha incorporato un tale algoritmo. Altri algoritmi per l'analisi di sequenza noti nell'arte includono ADVANCE e ADAM come descritto in Torellis e Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10: 3-5; e FASTA descritto in Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8. All'interno di FASTA, ktup è un'opzione di controllo che imposta la sensibilità e la velocità della ricerca.

Le mutazioni, incluse le sostituzioni, inserzioni e delezioni conservative e tollerate, possono essere introdotte nelle sequenze fornite utilizzando qualsiasi metodo appropriato inclusi, ma non limitati a, quelli basati su reazione a catena della polimerasi (PCR), clonaggio basato su enzimi di restrizione o clonaggio indipendente da ligazione (LIC). Questi metodi sono descritti in dettaglio in molti dei testi standard di biologia molecolare. Per ulteriori dettagli riguardanti la reazione a catena della polimerasi (PCR) e il clonaggio basato su enzimi di restrizione, vedere Sambrook & Russell, (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3^a Ed.) CSHL Press. Ulteriori informazioni su procedure di clonaggio indipendente da ligazione (LIC) possono essere trovate in Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6(1): 30-6. Le sequenze di TCR fornite dall'invenzione possono essere ottenute da sintesi allo stato solido, o

qualsiasi altro metodo appropriato noto nell'arte.

I TCR dell'invenzione hanno la proprietà di legare il complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02. I TCR dell'invenzione sono stati riscontrati riconoscere fortemente questo epitopo rispetto ad altri epitopi irrilevanti e sono quindi particolarmente adatti come vettori di bersagliamento per l'erogazione di agenti terapeutici o etichette rilevabili a cellule e tessuti che presentano quegli epitopi. La specificità nel contesto di TCR dell'invenzione si riferisce alla loro capacità di riconoscere cellule bersaglio HLA-A*02 che sono positive per antigene, pur avendo una capacità minima di riconoscere cellule bersaglio HLA-A*02 che sono negative per antigene.

La specificità può essere misurata *in vitro*, ad esempio, in saggi cellulari come quelli descritti nell'Esempio 6. Per testare la specificità, i TCR possono essere in forma solubile e/o possono essere fusi a un effettore immunitario e/o possono essere espressi sulla superficie di cellule, come le cellule T. Il riconoscimento può essere determinato misurando il livello di attivazione di cellule T in presenza di un TCR dell'invenzione e cellule bersaglio. Il riconoscimento minimo di cellule bersaglio negative per antigene è definito come un livello di attivazione di cellule T inferiore al 20%, preferibilmente inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5%, e più preferibilmente inferiore all'1%, del livello prodotto in presenza di cellule bersaglio positive per antigene, se misurate nelle stesse condizioni e ad una concentrazione di TCR terapeuticamente rilevante. Per i TCR solubili dell'invenzione una concentrazione terapeuticamente rilevante può essere definita come una

concentrazione di TCR di 10^{-9} M o inferiore, e/o una concentrazione fino a 100, preferibilmente fino a 1000 volte maggiore del corrispondente valore di EC50. Le cellule positive per antigene possono essere ottenute mediante pulsazione del peptide utilizzando una concentrazione di peptide adatta per ottenere un livello di presentazione di antigene paragonabile a cellule di cancro (ad esempio, peptide 10^{-9} M, come descritto in Bossi et al., (2013) Oncoimmunol. 1;2 (11):e26840) oppure, possono presentare naturalmente detto peptide. Preferibilmente, sia le cellule positive per antigene che quelle negative per antigene sono cellule umane. Preferibilmente le cellule positive per antigene sono cellule di cancro umane. Le cellule negative per antigene includono preferibilmente quelle derivate da tessuti umani sani.

La specificità può in aggiunta, o in alternativa, riferirsi alla capacità di un TCR di legare un complesso di GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 e non ad un pannello di complessi alternativi di peptide-HLA. Questo può, ad esempio, essere determinato mediante il metodo Biacore dell'Esempio 3. Detto pannello può contenere almeno 5, e preferibilmente almeno 10, complessi alternativi di peptide-HLA-A*02. I peptidi alternativi possono condividere un basso livello di identità di sequenza con SEQ ID NO: 1 e possono essere naturalmente presentati. Peptidi alternativi possono essere derivati da proteine espresse in tessuti umani sani. Il legame al complesso di GVDGREHTV-HLA-A*02 può essere almeno 2 volte maggiore rispetto ad altri complessi di peptide-HLA naturalmente presentati, più preferibilmente almeno 10 volte, o almeno 50 volte o almeno 100 volte maggiore, anche più preferibilmente

almeno 400 volte maggiore.

Un approccio alternativo o aggiuntivo per determinare la specificità di TCR può essere quello di identificare il motivo di riconoscimento del peptide del TCR utilizzando una mutagenesi sequenziale, ad esempio scansione di alanina. I residui che fanno parte del motivo di legame sono quelli che non sono permissibili a sostituzione. Nessuna sostituzione consentita può essere definita come quelle posizioni peptidiche in cui l'affinità di legame del TCR è ridotta di almeno il 50%, o preferibilmente almeno dell'80% rispetto all'affinità di legame per il peptide non mutato. Un tale approccio è ulteriormente descritto in Cameron et al., (2013), *Sci Transl Med.* 7 agosto 2013; 5 (197): 197ra103 e WO2014096803. La specificità del TCR in questo caso può essere determinata identificando peptidi contenenti un motivo alternativo, in particolare peptidi contenenti un motivo alternativo nel proteoma umano, e testando questi peptidi per il legame al TCR. Il legame del TCR a uno o più peptidi alternativi può indicare una mancanza di specificità. In questo caso possono essere necessari ulteriori test di specificità di TCR tramite saggi cellulari.

Come è noto ai tecnici esperti del ramo, i peptidi derivati dai membri della famiglia di MAGE possono condividere un elevato livello di identità di sequenza con i peptidi derivati da altri membri della famiglia di MAGE. Ad esempio, ci sono peptidi derivati da MAGE-A8 e MAGE-B2 che differiscono solo per due residui da SEQ ID NO 1 (GVYDGREHTV). Detti peptidi e cellule che esprimono detti membri della famiglia di MAGE possono essere esclusi dalla definizione di specificità fornita sopra, in

particolare se detti membri della famiglia di MAGE sono noti per essere antigeni di cancro, come MAGE-A8 e MAGE-B2. I TCR dell'invenzione possono quindi riconoscere peptidi con percentuale di identità di sequenza elevata che sono derivati da altri membri della famiglia di MAGE, inclusi MAGE-A8 e MAGE-B2 e presentati nel contesto di HLA A*02. Il riconoscimento di detti peptidi da parte di TCR dell'invenzione può essere a un livello simile o più basso rispetto al riconoscimento di GYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02.

Alcuni TCR dell'invenzione possono avere un profilo di sicurezza ideale per un uso come reagenti terapeutici. In questo caso i TCR possono essere in forma solubile e possono preferibilmente essere fusi a un effettore immunitario. Un profilo di sicurezza ideale significa che oltre a dimostrare una buona specificità, i TCR dell'invenzione possono aver superato ulteriori test di sicurezza preclinici. Esempi di tali test includono saggi del sangue intero per confermare un rilascio minimo di citochine in presenza di sangue intero e quindi un basso rischio di causare una potenziale sindrome da rilascio di citochine *in vivo* e test di alloreattività per confermare un basso potenziale di riconoscimento di tipi di HLA alternativi.

Alcuni TCR solubili dell'invenzione possono essere suscettibili di purificazione ad alta resa. Alta resa significa una resa maggiore dell'1%, o più preferibilmente maggiore del 10%, o più elevata.

I TCR dell'invenzione possono avere una K_D per il complesso di GYDGREHTV-HLA-A*02 maggiore di (cioè più forte di) 200 μ M, ad esempio tra 1 pM e 200 μ M. Alcuni TCR dell'invenzione possono avere

una K_D per il complesso da circa 1 pM a circa 400 nM, da circa 1 pM a circa 200 pM, da circa 1 pM a circa 100 pM. Alcuni TCR dell'invenzione possono avere una K_D per il complesso di circa 20-80 pM. I TCR dell'invenzione possono avere un'emivita di legame ($T_{1/2}$) per il complesso nell'intervallo da circa 1 sec a circa 60 ore, da 1 min a circa 60 ore, da circa 20 min a circa 50 ore, o da circa 2 ore a circa 35 ore. Alcuni TCR dell'invenzione possono avere una $T_{1/2}$ per il complesso da circa 8 ore a 35 ore. I TCR che devono essere utilizzati come terapeutici solubili e/o diagnostici quando accoppiati a un'etichetta rilevabile o agente terapeutico hanno preferibilmente una K_D per il complesso da circa 1 pM a circa 100 pM, o da circa 20 pM a circa 80 pM, e/ o un'emivita di legame per il complesso da circa 2 ore a 60 ore, o da circa 8 ore a circa 35 ore. Alcuni TCR dell'invenzione possono essere adatti per applicazioni di terapia adottiva; tali TCR possono avere una K_D per il complesso da circa 50 nM a circa 200 μ M, o da circa 100 nM a circa 1 μ M e/o un'emivita di legame per il complesso da circa 3 sec a circa 12 min.

Alcuni TCR preferiti sono in grado di generare una risposta di cellule T altamente potente *in vitro* contro cellule positive per antigene, in particolare quelle cellule che presentano bassi livelli di antigene tipico di cellule di cancro (cioè circa 50 antigeni per cellula (Bossi et al., (2013) *Oncoimmunol.* 1;2 (11): e26840; Purbhoo et al.,(2006). *J Immunol* 176(12): 7308-7316.)). Tali TCR possono essere in forma solubile e collegati a un effettore immunitario come un anticorpo anti-CD3. La risposta di cellule T misurata può essere il rilascio di marcatori di

attivazione di cellule T come l'interferone γ o il Granzyme B, o l'uccisione cellulare o un'altra misura dell'attivazione di cellule T. Preferibilmente una risposta molto potente è una con valore di EC_{50} nell'intervallo pM, ad esempio 100 pM o più bassa.

Alcuni TCR preferiti dell'invenzione hanno un'affinità di legame e/o un'emivita di legame per il complesso di GYDGRHTV-HLA-A*02 sostanzialmente più alta di quella del TCR nativo. L'aumento dell'affinità di legame di un TCR nativo spesso riduce la specificità del TCR per il suo ligando peptide-MHC, e questo è dimostrato in Zhao et al., (2007) *J.Immunol*, 179:9, 5845-5854. Tuttavia, tali TCR dell'invenzione rimangono specifici per il complesso di GYDGRHTV-HLA-A*02, nonostante abbiano un'affinità di legame sostanzialmente più elevata rispetto al TCR nativo.

L'affinità di legame (inversamente proporzionale alla costante di equilibrio K_D) e l'emivita di legame (espressa come $T_{1/2}$) possono essere determinate usando la risonanza plasmonica di superficie (BIAcore) e/o il metodo dell'Octet dell'Esempio 3 nel presente documento. Si apprezzerà che raddoppiare l'affinità di un TCR dà come risultato un dimezzamento della K_D . $T_{1/2}$ viene calcolata come $\ln 2$ diviso per la off-rate (k_{off}). Pertanto, raddoppiare la $T_{1/2}$ dà come risultato un dimezzamento della k_{off} . I valori di K_D e k_{off} per i TCR vengono solitamente misurati per le forme solubili del TCR, cioè quelle forme che sono troncate per rimuovere i residui di dominio citoplasmatico e transmembrana. Preferibilmente l'affinità di legame o l'emivita di legame di un dato TCR viene misurata più volte, ad esempio 3 o più volte,

utilizzando lo stesso protocollo di saggio e viene presa una media dei risultati.

Per l'uso come agente di bersagliamento per erogare agenti terapeutici alla cellula presentante l'antigene, il TCR può essere in forma solubile (cioè senza domini transmembrana o citoplasmatici). Per stabilità, i TCR dell'invenzione, e preferibilmente i TCR $\alpha\beta$ eterodimerici solubili, possono avere un legame disolfuro introdotto tra i residui dei rispettivi domini costanti, come descritto, ad esempio, in WO 03/020763. Uno o entrambi i domini costanti extracellulari presenti in un eterodimero $\alpha\beta$ dell'invenzione possono essere troncati al C terminale o ai C terminali, ad esempio fino a 15, o fino a 10 o fino a 8 o meno amminoacidi. Il C terminale del dominio costante extracellulare di catena alfa può essere troncato di 8 amminoacidi. Uno o entrambi i domini costanti extracellulari possono contenere una o più mutazioni. La costante extracellulare di catena alfa può avere un residuo di asparagina (N) o lisina (K) in posizione 4 a causa di un polimorfismo naturale. Per l'uso nella terapia adottiva, un TCR eterodimerico $\alpha\beta$ può, ad esempio, essere trasfettato come catene di lunghezza intera aventi sia domini citoplasmatici che transmembrana. I TCR per l'uso in terapia adottiva possono contenere un legame disolfuro corrispondente a quello che si trova in natura tra i rispettivi domini costanti alfa e beta, in aggiunta o in alternativa può essere presente un legame disolfuro non nativo.

I TCR dell'invenzione possono essere eterodimeri $\alpha\beta$. I TCR dell'invenzione possono essere in formato di catena singola. I formati a catena singola includono, ma non sono limitati a, polipeptidi di TCR $\alpha\beta$

dei tipi $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$, $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$, o $V\alpha$ - $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$, in cui $V\alpha$ e $V\beta$ sono rispettivamente regioni variabili di TCR α e β , $C\alpha$ e $C\beta$ sono regioni costanti di TCR α e β rispettivamente e L è una sequenza di linker (Weidanz et al., (1998) J Immunol Methods. 1 dicembre; 221(1-2):59-76; Epel et al., (2002), Cancer Immunol Immunother. novembre; 51(10):565-73; WO 2004/033685; WO9918129). Uno o entrambi i domini costanti possono essere di lunghezza intera, oppure possono essere troncati come descritto sopra e/o contenere mutazioni. La costante extracellulare di catena alfa può avere un residuo di asparagina (N) o lisina (K) in posizione 4 a causa di un polimorfismo naturale. In alcune forme di realizzazione, i TCR a catena singola dell'invenzione possono avere un legame disolfuro introdotto tra residui dei rispettivi domini costanti, come descritto in WO 2004/033685. I TCR a catena singola sono ulteriormente descritti in 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).

Come risulterà evidente ai tecnici del ramo, può essere possibile troncare le sequenze fornite al C-terminale e/o N-terminale degli stessi, di 1, 2, 3, 4, 5 o più residui, senza intaccare sostanzialmente le caratteristiche di legame del TCR.

I TCR eterodimerici alfa-beta dell'invenzione comprendono solitamente una sequenza di dominio costante TRAC di catena alfa e/o una sequenza di dominio costante TRBC1 o TRBC2 di catena beta. Le sequenze di dominio costante di catena alfa e beta possono essere

modificate mediante troncamento o sostituzione per eliminare il legame disolfuro nativo tra Cys4 dell'esone 2 di TRAC e Cys2 dell'esone 2 di TRBC1 o TRBC2. L'una o più sequenze di dominio costante di catena alfa e/o beta possono essere modificate mediante sostituzione di residui di cisteina per Thr 48 di TRAC e Ser 57 di TRBC1 o TRBC2, dette cisteine formando un legame disolfuro tra i domini costanti alfa e beta del TCR. TRBC1 o TRBC2 possono inoltre includere una mutazione da cisteina ad alanina in posizione 75 del dominio costante e una mutazione da asparagina ad acido aspartico in posizione 89 del dominio costante. Il dominio costante può contenere in aggiunta o in alternativa ulteriori mutazioni, sostituzioni o delezioni rispetto alle sequenze native di TRAC e/o TRBC1/2. Il termine TRAC e TRBC1/2 comprende varianti polimorfiche naturali, ad esempio da N a K nella posizione 4 di TRAC (Bragado et al Int Immunol. febbraio 1994;6(2):223-30).

Sono anche divulgati qui varianti, frammenti e derivati dei TCR forniti dall'invenzione.

Qui vengono divulgate particelle che mostrano i TCR dell'invenzione e l'inclusione di dette particelle all'interno di una libreria di particelle. Tali particelle includono ma non sono limitate a fagi, ribosomi di lievito o cellule di mammifero. I metodi per produrre tali particelle e librerie sono noti nell'arte (per esempio vedere WO2004/044004; WO01/48145, Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

In un ulteriore aspetto, la presente invenzione fornisce un acido nucleico codificante per una catena alfa di TCR e una catena beta di TCR del TCR dell'invenzione e/o una molecola di fusione TCR-anti-CD3

dell'invenzione.

In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico è cDNA. L'acido nucleico può essere non presente in natura e/o purificato e/o ingegnerizzato. La sequenza di acido nucleico può essere ottimizzata per codone, in accordo con il sistema di espressione utilizzato.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un vettore di espressione che comprende un acido nucleico dell'invenzione.

L'invenzione fornisce anche una cellula che ospita (a) un vettore di espressione dell'invenzione, codificante per le catene alfa e beta in una singola cornice di lettura aperta, o due distinte cornici di lettura aperta; oppure (b) un primo vettore di espressione che comprende un acido nucleico codificante per la catena alfa di un TCR dell'invenzione, e un secondo vettore di espressione che comprende un acido nucleico codificante per la catena beta di un TCR dell'invenzione. Tali cellule sono particolarmente utili nella terapia adottiva. Le cellule dell'invenzione possono essere isolate e/o ricombinanti e/o non presenti in natura e/o ingegnerizzate.

Poiché i TCR dell'invenzione hanno utilità nella terapia adottiva, l'invenzione include una cellula non presente in natura e/o purificata e/o ingegnerizzata, in particolare una cellula T, che presenta un TCR dell'invenzione. L'invenzione fornisce anche una popolazione espansa di cellule T che presentano un TCR dell'invenzione. Esistono numerosi metodi adatti per la trasfezione di cellule T con acido nucleico (come DNA, cDNA o RNA) che codifica per i TCR dell'invenzione (si veda ad esempio Robbins et al., (2008) J Immunol. 180: 6116-6131). Le cellule T che

esprimono i TCR dell'invenzione saranno adatte per l'uso nel trattamento del cancro basato su terapia adottiva. Come sarà noto ai tecnici del ramo, esistono numerosi metodi adatti con cui può essere effettuata una terapia adottiva (si veda ad esempio Rosenberg et al., (2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299-308).

I TCR solubili dell'invenzione sono utili per erogare etichette rilevabili o agenti terapeutici a cellule presentanti l'antigene e tessuti contenenti cellule presentanti l'antigene. Essi possono quindi essere associati (in modo covalente o meno) ad un'etichetta rilevabile (a fini diagnostici in cui il TCR viene utilizzato per rilevare la presenza di cellule che presentano il complesso di GYDGREHTV-HLA-A*02); un agente terapeutico; o una porzione funzionale modificante la PK.

Esempi di porzioni funzionali modificanti la PK includono, ma non sono limitati a, PEG (Dozier et al., (2015) Int J Mol Sci. 28 ottobre;16(10):25831-64 e Jevsevar et al., (2010) Biotechnol J. gennaio;5(1):113-28), PASilazione (Schlapschy et al., (2013) Protein Eng Des Sel. Agosto;26(8):489-501), albumina (Dennis et al., (2002) J Biol Chem. 20 Settembre;277(38):35035-43) e/o polipeptidi non strutturati (Schellenberger et al., (2009) Nat Biotechnol. dicembre;27(12):1186-90).

Le etichette rilevabili per scopi diagnostici includono, ad esempio, etichette fluorescenti, radioetichette, enzimi, sonde di acido nucleico e reagenti di contrasto.

Gli agenti terapeutici che possono essere associati ai TCR dell'invenzione includono immunomodulatori, composti radioattivi, enzimi

(perforina per esempio) o agenti chemioterapeutici (cis-platino per esempio). Per garantire che gli effetti tossici siano esercitati nella posizione desiderata, la tossina potrebbe essere all'interno di un liposoma collegato al TCR in modo tale che il composto venga rilasciato lentamente. Ciò preverrà effetti dannosi durante il trasporto nel corpo e assicurerà che la tossina abbia il massimo effetto dopo il legame del TCR alle cellule che presentano l'antigene rilevante.

Altri agenti terapeutici adatti includono:

- agenti citotossici a piccole molecole, ovvero composti con la capacità di uccidere cellule di mammifero aventi un peso molecolare inferiore a 700 Dalton. Tali composti potrebbero anche contenere metalli tossici in grado di avere un effetto citotossico. Inoltre, deve essere compreso che questi agenti citotossici a piccole molecole includono anche pro-farmaci, cioè composti che decadono o vengono convertiti in condizioni fisiologiche per rilasciare agenti citotossici. Esempi di tali agenti includono cis-platino, derivati della maitansina, rachelmicina, calicheamicina, docetaxel, etoposide, gemcitabina, ifosfamida, irinotecan, melfalan, mitoxantrone, sorfimer sodio fotofrin II, temozolomide, topotecan, trimetreato 27arbour27ato, auristatina E vincristina e doxorubicina;
- citotossine peptidiche, cioè proteine o loro frammenti con la capacità di uccidere cellule di mammifero. Ad esempio, ricina, tossina difterica, esotossina batterica di pseudomonas A, Dnasi e Rnasi;
- radionuclidi, cioè isotopi instabili di elementi che decadono con l'emissione simultanea di una o più particelle α o β , o raggi γ . Ad

esempio, iodio 131, renio 186, indio 111, ittrio 90, bismuto 210 e 213, attinio 225 e astato 213; agenti chelanti possono essere usati per facilitare l'associazione di questi radionuclidi ai TCR ad alta affinità, o loro multimeri;

- Immunostimolanti, cioè molecole effettrici immunitarie che stimolano la risposta immunitaria. Ad esempio, citochine come IL-2 e IFN- γ ,

- Superantigeni e loro mutanti;

- fusioni di TCR-HLA, ad esempio fusione a un complesso di peptide-HLA, in cui detto peptide è derivato da un comune patogeno umano, come il virus di Epstein Barr (EBV);

- chemochine come IL-8, fattore piastrinico 4, proteina stimolatrice della crescita del melanoma, eccetera;

- anticorpi o loro frammenti, inclusi anticorpi anti-determinanti di cellule T o NK (ad esempio anti-CD3, anti-CD28 o anti-CD16);

- impalcature proteiche alternative con caratteristiche di legame simili ad anticorpi;

- attivatori del complemento;

- domini proteici xenogenici, domini proteici allogenici, domini proteici virali/batterici, peptidi virali/batterici.

Una forma di realizzazione preferita è fornita da un TCR dell'invenzione associato (solitamente mediante fusione a un N- o C-terminale della catena alfa o beta) con un anticorpo anti-CD3, o un frammento funzionale o variante di detto anticorpo anti-CD3 (tali fusioni

di TCR-anti-CD3 possono essere denominate molecole ImmTAC™). Come qui utilizzato, il termine "anticorpo" racchiude tali frammenti e varianti. Esempi di anticorpi anti-CD3 includono, ma non sono limitati a, OKT3, UCHT-1, BMA-031 e 12F6. Frammenti di anticorpo e varianti/analoghi che sono adatti per l'uso nelle composizioni e nei metodi qui descritti includono minibody, frammenti Fab, frammenti F(ab')₂, frammenti dsFv e scFv, Nanobody™ (questi costrutti, commercializzati da Ablynx (Belgio), comprendono un singolo dominio pesante variabile di immunoglobulina sintetica derivato da un anticorpo di camelide (ad esempio cammello o lama)) e Anticorpi di dominio (Domantis (Belgio), comprendente un singolo dominio pesante variabile di immunoglobulina maturato per affinità o un dominio leggero variabile di immunoglobulina) o impalcature proteiche alternative che presentano caratteristiche di legame simili ad anticorpi come Affibody (Affibody (Svezia), compresa l'impalcatura di proteina A ingegnerizzata) o Anticaline (Pieris (Germania)), comprese anticaline ingegnerizzate) solo per citarne alcuni.

Il collegamento del TCR e dell'anticorpo anti-CD3 può avvenire tramite attacco covalente o non covalente. L'attacco covalente può essere diretto o indiretto tramite una sequenza di linker. Le sequenze di linker sono generalmente flessibili, in quanto sono costituite principalmente da amminoacidi come glicina, alanina e serina che non hanno catene laterali voluminose che possono limitare la flessibilità. Le lunghezze utilizzabili od ottimali delle sequenze di linker sono facilmente determinate. Spesso la sequenza di linker sarà inferiore a circa 12, come inferiore a 10, o da 2 a 10 amminoacidi in lunghezza. Linker adatti che

possono essere utilizzati nei TCR dell'invenzione includono, ma non sono limitati a: 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), e GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37) (come descritto in WO2010/133828).

Di seguito sono fornite alcune forme di realizzazione preferite di costrutti di fusione di anti-CD3-TCR dell'invenzione:

(Tabella 7)

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

Ciascun linker di SEQ ID NO: 30-37 può essere utilizzato con ciascuna o qualsiasi delle forme di realizzazione preferite dei costrutti di fusione di CD3-TCR. Ad esempio, una fusione di TCR-CD3 comprendente la catena alfa di SEQ ID NO: 24 e la catena beta di SEQ ID NO: 29, in cui la catena beta è fusa con un scFv di anti-CD3 tramite un linker di qualsiasi delle SEQ ID NO: 31-37 è inclusa nell'invenzione.

Per alcuni scopi, i TCR dell'invenzione possono essere aggregati in un complesso comprendente diversi TCR per formare un complesso

di TCR multivalente. Esistono numerose proteine umane che contengono un dominio di multimerizzazione che può essere utilizzato nella produzione di complessi di TCR multivalenti. Ad esempio il dominio di tetramerizzazione di p53 che è stato utilizzato per produrre tetrameri di frammenti di anticorpo scFv che hanno mostrato una persistenza sierica aumentata e una off-rate ridotta significativamente rispetto al frammento scFv monomero (Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392). L'emoglobina ha anche un dominio di tetramerizzazione che potrebbe essere utilizzato per questo tipo di applicazione. Un complesso di TCR multivalente dell'invenzione può avere una capacità di legame intensificata per il complesso di GVYDGREHTV-HLA-A*02 rispetto a un tipo selvatico non multimerico o eterodimero di recettore di cellule T dell'invenzione. Tali complessi di TCR multivalenti secondo l'invenzione sono particolarmente utili per tracciare o bersagliare cellule che presentano particolari antigeni *in vitro* o *in vivo*, e sono anche utili come intermedi per la produzione di ulteriori complessi di TCR multivalenti aventi tali usi.

Come è noto nell'arte, i TCR possono essere soggetti a modificazioni post-traduzionali. La glicosilazione è una di tali modificazioni, che comprende l'attacco covalente di porzioni funzionali oligosaccaridiche ad amminoacidi definiti nella catena di TCR. Ad esempio, i residui di asparagina o i residui di serina/treonina sono posizioni ben note per l'attacco di oligosaccaridi. Lo stato di glicosilazione di una particolare proteina dipende da una serie di fattori, inclusi sequenza proteica, conformazione proteica e disponibilità di determinati

enzimi. Inoltre, lo stato di glicosilazione (cioè tipo di oligosaccaride, collegamento covalente e numero totale di attacchi) può influenzare una funzione della proteina. Pertanto, quando si producono proteine ricombinanti, è spesso desiderabile controllare la glicosilazione. Una glicosilazione controllata è stata utilizzata per migliorare terapeutici a base di anticorpi. (Jefferis et al., (2009) Nat Rev Drug Discov Marzo;8(3):226-34.). Per i TCR solubili dell'invenzione, la glicosilazione può essere controllata *in vivo*, utilizzando ad esempio particolari linee cellulari, o *in vitro*, mediante modificazione chimica. Tali modificazioni sono desiderabili, dal momento che la glicosilazione può migliorare la farmacocinetica, ridurre l'immunogenicità e imitare più strettamente una proteina umana nativa (Sinclair e Elliott, (2005) Pharm Sci. agosto; 94(8):1626-35).

Per la somministrazione a pazienti, i TCR dell'invenzione (preferibilmente associati a un'etichetta rilevabile o ad un agente terapeutico o espressi su una cellula T trasfettata), le molecole di fusione di TCR-anti-CD3, gli acidi nucleici, i vettori di espressione o le cellule dell'invenzione possono essere forniti in una composizione farmaceutica insieme a uno o più trasportatori o eccipienti farmaceuticamente accettabili. TCR terapeutici o di imaging, o cellule, in conformità con l'invenzione saranno solitamente forniti come parte di una composizione farmaceutica sterile che normalmente includerà un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Questa composizione farmaceutica può essere in qualsiasi forma adatta (a seconda del metodo desiderato per somministrarla a un paziente). Può essere fornita in forma di dosaggio

unitario, sarà generalmente fornita in un contenitore sigillato e può essere fornita come parte di un kit. Un tale kit normalmente (anche se non necessariamente) dovrebbe includere istruzioni per l'uso. Esso può includere una pluralità di dette forme di dosaggio unitario.

La composizione farmaceutica può essere adattata per una somministrazione mediante qualsiasi via appropriata, come via parenterale (inclusa sottocutanea, intramuscolare o endovenosa), enterale (inclusa orale o rettale), inalatoria o intranasale. Tali composizioni possono essere preparate mediante qualsiasi metodo noto nell'arte farmaceutica, ad esempio miscelando l'ingrediente attivo con l'uno o più trasportatori o eccipienti in condizioni sterili.

I dosaggi delle sostanze della presente invenzione possono variare tra ampi limiti, a seconda della malattia o del disturbo da trattare, dell'età e delle condizioni dell'individuo da trattare, eccetera, un intervallo di dosaggio adatto per un TCR solubile dell'invenzione associato a un anticorpo anti-CD3 può essere compreso tra 25 ng/kg e 50 µg/kg. Alla fine un medico determinerà i dosaggi appropriati da utilizzare.

TCR, composizioni farmaceutiche, vettori, acidi nucleici e cellule dell'invenzione possono essere forniti in forma sostanzialmente pura, ad esempio puri almeno all'80%, almeno all'85%, almeno al 90%, almeno al 91%, almeno al 92%, almeno al 93%, almeno al 94%, almeno al 95%, almeno al 96%, almeno al 97%, almeno al 98%, almeno al 99% o al 100%.

Dall'invenzione sono forniti anche un TCR, una molecola di fusione di TCR-anti-CD3, un acido nucleico, una composizione farmaceutica ed/o una cellula dell'invenzione per l'uso in un

medicamento, preferibilmente per l'uso in un metodo di trattamento di cancro o di un tumore. Viene qui divulgata una formulazione iniettabile per la somministrazione a un soggetto umano comprendente un TCR, una molecola di fusione di TCR-anti-CD3, un acido nucleico, una composizione farmaceutica o una cellula dell'invenzione.

Il cancro può essere della mammella, dell'esofago, della testa e del collo, del polmone, dell'ovaio o della vescica. Il tumore può esprimere MAGE A4 e/o può essere un tumore solido. Il TCR, la molecola di fusione TCR-anti-CD3, l'acido nucleico, la composizione farmaceutica o la cellula dell'invenzione possono essere somministrati mediante iniezione, come iniezione endovenosa o intratumorale diretta. Il soggetto umano può essere un sottotipo HLA-A*02.

L'invenzione fornisce anche un metodo per produrre un TCR o una molecola di fusione di TCR-anti-CD3 dell'invenzione, comprendente a) mantenere una cellula dell'invenzione in condizioni ottimali per un'espressione dell'acido di catene di TCR e b) isolare le catene di TCR.

Caratteristiche preferite di ciascun aspetto dell'invenzione sono come per ciascuno degli altri aspetti *mutatis mutandis*.

Descrizione dei disegni

Figura 1 - fornisce la sequenza amminoacidica delle regioni extracellulari di una catena alfa e beta di TCR di MAGE A4 nativo.

Figura 2 - fornisce la sequenza amminoacidica delle regioni extracellulari di una catena alfa e beta di TCR di MAGE A4 nativo solubile.

Figura 3 - fornisce sequenze amminoacidiche di regioni variabili di catena alfa di TCR di MAGE A4 mutato.

Figura 4 - fornisce sequenze amminoacidiche di regioni variabili di catena beta di TCR di MAGE A4 mutato.

Figura 5 - fornisce esempi di sequenze amminoacidiche di catena alfa di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 6 - fornisce esempi di sequenze amminoacidiche di catena beta di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 7 - fornisce dati cellulari che dimostrano la potenza e la specificità di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 8 - fornisce dati cellulari che dimostrano la potenza e la specificità di ulteriori molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 9 - fornisce ulteriori evidenze di specificità di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 10 - fornisce ulteriori dati di specificità per molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3.

Figura 11 - fornisce evidenze che molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3 portano all'uccisione di cellule di cancro.

L'invenzione è ulteriormente descritta nei seguenti esempi non limitativi.

Esempi

Esempio 1 - Espressione, ripiegamento e purificazione di TCR solubili

Metodo

Le sequenze di DNA che codificano per le regioni extracellulari alfa e beta di TCR solubili dell'invenzione sono state clonate separatamente in plasmidi di espressione basati su pGMT7 utilizzando

metodi standard (come descritto in Sambrook, et al. Molecular cloning. Vol. 2. (1989) New York: Cold spring harbour laboratory press). I plasmidi di espressione sono stati trasformati separatamente in *E. coli* ceppo Rosetta (BL21pLysS) e singole colonie resistenti ad ampicillina sono state coltivate a 37 °C in terreno TYP (+ ampicillina 100 µg/ml) fino a una OD₆₀₀ di ~0,6-0,8 prima di indurre l'espressione di proteina con IPTG 0,5 mM. Le cellule sono state raccolte tre ore dopo l'induzione mediante centrifugazione. I pellet cellulari sono stati lisati con il reagente di estrazione proteica BugBuster (Merck Millipore) secondo le istruzioni del produttore. I pellet di corpo di inclusione sono stati recuperati mediante centrifugazione. I pellet sono stati lavati due volte in tampone Triton (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, Triton-X100 allo 0,5%, NaCl 100 mM, NaEDTA 10 mM) e infine risospesi in tampone privo di detergente (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, NaEDTA 10 mM). La resa proteica di corpo di inclusione è stata quantificata solubilizzando con guanidina-HCl 6 M e misurando la OD₂₈₀. La concentrazione proteica è stata quindi calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione. La purezza di corpo di inclusione è stata misurata solubilizzando con urea 8 M e caricando ~ 2 µg su SDS-PAGE al 4-20% in condizioni riducenti. La purezza è stata quindi stimata o calcolata utilizzando un software di densitometria (Chemidoc, Biorad). I corpi di inclusione sono stati conservati a +4 °C per la conservazione a breve termine e a -20 °C o -70 °C per la conservazione a lungo termine.

Per il ripiegamento di TCR solubile, i corpi di inclusione contenenti catene α e β sono stati prima miscelati e diluiti in 10 ml di tampone di solubilizzazione/denaturazione (guanidina cloridrato 6 M, Tris

HCl 50 mM pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 20 mM) seguito da incubazione per 30 min a 37 °C. Il ripiegamento è stato quindi avviato mediante un'ulteriore diluizione in 1 L di tampone di ripiegamento (Tris 100 mM pH 8,1, L-arginina HCL 400 mM, EDTA 2 mM, urea 4 M, cisteammia cloridrato 10 mM e cistammina dicloridrato 2,5 mM) e la soluzione è stata mescolata bene. La miscela ripiegata è stata dializzata contro 10 L di H₂O per 18-20 ore a 5 °C ± 3 °C. Dopo questo tempo, il tampone di dialisi è stato sostituito due volte con Tris 10 mM pH 8,1 (10 L) e la dialisi continuata per altre 15 ore. La miscela di ripiegamento è stata quindi filtrata attraverso filtri di cellulosa da 0,45 µm.

La purificazione di TCR solubili è stata avviata applicando il ripiegamento dializzato su una colonna a scambio anionico POROS® 50HQ ed eluendo la proteina legata con un gradiente di NaCl 0-500 mM in Tris 20 mM pH 8,1 su 50 volumi di colonna utilizzando un purificatore Akta® (GE Healthcare). Le frazioni di picco di TCR sono state identificate mediante SDS PAGE prima di essere raggruppate e concentrate. Il campione concentrato è stato quindi applicato a una colonna di filtrazione su gel Superdex® 75HR (GE Healthcare) pre-equilibrata nel tampone PBS di Dulbecco. Le frazioni di picco di TCR sono state raggruppate e concentrate e la resa finale di materiale purificato è stata calcolata.

Esempio 2- Espressione, ripiegamento e purificazione di molecole di ImmTAC (molecole di fusione di TCR solubile-anti-CD3)

Metodo

La preparazione di ImmTAC è stata eseguita come descritto nell'Esempio 1, tranne per il fatto che la catena beta di TCR è stata fusa

tramite un linker a un anticorpo a catena singola anti-CD3. In aggiunta è stato eseguito un passaggio di scambio cationico durante la purificazione dopo lo scambio anionico. In questo caso le frazioni di picco dallo scambio anionico sono state diluite 20 volte in MES 20 mM (pH 6,5) e applicate a una colonna di scambio cationico POROS® 50HS. La proteina legata è stata eluita con un gradiente di NaCl 0-500 mM in MES 20 mM. Le frazioni di ImmTAC di picco sono state riunite e regolate a Tris 50 mM pH 8,1, prima di essere concentrate e applicate direttamente alla matrice di filtrazione del gel come descritto nell'Esempio 1.

Esempio 3 - Caratterizzazione di legame

L'analisi di legame di TCR solubili purificati e molecole di ImmTAC al complesso di peptide-HLA rilevante è stata effettuata mediante risonanza plasmonica di superficie, utilizzando uno strumento BIAcore 3000 o BIAcore T200, o mediante interferometria a biostrato, utilizzando uno strumento ForteBio Octet). Molecole di HLA-A*02 di classe I biotinilate sono state ripiegate con il peptide di interesse e purificate usando metodi noti a tecnici del ramo (O'Callaghan et al. (1999). Anal Biochem 266(1): 9-15; Garboczi, et al. (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89(8): 3429-3433). Tutte le misurazioni sono state effettuate a 25 °C in tampone PBS di Dulbecco, supplementato con P20 allo 0,005%.

Metodo BIAcore

I monomeri di peptide-HLA biotinilati sono stati immobilizzati su chip di sensore CM-5 accoppiati a streptavidina. Le costanti di legame all'equilibrio sono state determinate utilizzando diluizioni seriali di TCR solubile/ImmTAC iniettato a una portata costante di 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ su una

cella a flusso rivestita con ~ 200 unità di risposta (RU) del complesso di peptide-HLA-A*02. Le risposte all'equilibrio sono state normalizzate per ciascuna concentrazione di TCR sottraendo la risposta di tampone di massa su una cella a flusso di controllo contenente un peptide-HLA irrilevante. Il valore di K_D è stato ottenuto mediante interpolazione di curva non lineare utilizzando il software Prism e l'isoterma di legame Langmuir, $\text{legato} = C \cdot \text{Max} / (C + K_D)$, dove "legato" è il legame all'equilibrio in RU a concentrazione di TCR iniettata C e Max è il legame massimo.

Per interazioni ad alta affinità, parametri di legame sono stati determinati mediante analisi cinetica a singolo ciclo. Cinque differenti concentrazioni di TCR solubile/ImmTAC sono state iniettate su una cella a flusso rivestita con ~ 100-200 RU di complesso di peptide-HLA utilizzando una portata di 50-60 $\mu\text{l min}^{-1}$. Tipicamente, 60-120 μl di TCR solubile/ImmTAC sono stati iniettati a una concentrazione massima di 100-200 nM, con successive diluizioni di 2 volte utilizzate per le altre quattro iniezioni. La concentrazione più bassa è stata iniettata per prima. Per misurare la fase di dissociazione, il tampone è stato quindi iniettato fino a quando si è verificata una dissociazione $\geq 10\%$, tipicamente dopo 1-3 ore. I parametri cinetici sono stati calcolati utilizzando il software BIAevaluation®. La fase di dissociazione è stata adattata a una equazione di decadimento esponenziale singola che consente il calcolo dell'emivita. La costante di equilibrio K_D è stata calcolata da $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Metodo Octet

I monomeri di peptide-HLA biotinilati sono stati catturati a 1 nm

su biosensori di streptavidina (SA) (Pall ForteBio) pre-immobilizzati con streptavidina. I sensori sono stati bloccati con biotina libera (2 μM) per 2 minuti. Le costanti di legame all'equilibrio sono state determinate immergendo i biosensori caricati in TCR solubile/ImmTAC diluito in serie in una piastra di campione da 96 o 384 pozzetti. L'agitazione della piastra è stata impostata a 1000 giri/min. Per le interazioni a bassa affinità (intervallo μM) sono stati utilizzati un breve tempo di associazione (~ 2 minuti) e un breve tempo di dissociazione (~ 2 minuti). Le curve di legame sono state processate mediante doppia sottrazione di riferimento di biosensori di riferimento caricati con pHLA irrilevante utilizzando il software di analisi dei dati Octet (Pall ForteBio). Le risposte (nm) all'equilibrio sono state utilizzate per stimare il valore di K_D da grafici di stato stazionario interpolati all'equazione $\text{Risposta} = R_{\text{max}} \cdot \text{conc} / (K_D + \text{conc})$, dove "risposta" è il legame all'equilibrio in nm a ciascuna concentrazione di TCR (conc) e R_{max} è la risposta di legame massima alla saturazione di pHLA.

Per interazioni ad alta affinità (intervallo nM - pM), i parametri cinetici sono stati determinati dalle curve di legame a concentrazioni di TCR/ImmTAC ≥ 3 , tipicamente 10 nM, 5 nM e 2,5 nM. Il tempo di associazione è stato di 30 minuti e il tempo di dissociazione di 1 - 2 ore. Le curve di legame sono state processate mediante doppia sottrazione di riferimento di biosensori di riferimento caricati con pHLA irrilevante e bloccati con biotina. I parametri cinetici k_{on} e k_{off} sono stati calcolati mediante interpolazione globale direttamente alle curve di legame utilizzando il software di analisi dei dati Octet (Pall ForteBio). K_D è stata

calcolata da k_{off}/k_{on} e l'emivita di dissociazione è stata calcolata da $t_{1/2} = 0,693/k_{off}$.

Esempio 4 - Caratterizzazione di legame del TCR nativo

Un TCR nativo solubile è stato preparato secondo i metodi descritti nell'Esempio 1 e il legame a pHLA analizzato secondo l'Esempio 3. Le sequenze amminoacidiche delle catene alfa e beta hanno corrisposto a quelle mostrate nella Figura 2. HLA-A*02 solubile biotinilato è stato preparato con il peptide di MAGE A4 GVDGREHTV e immobilizzato su un chip sensore BIAcore.

Risultati

Il legame è stato determinato a varie concentrazioni e il valore di K_D per l'interazione è stato determinato essere 142 μ M. La reattività incrociata (specificità) è stata valutata rispetto a un pannello di 15 complessi di peptide-HLA-A*02 irrilevanti usando il metodo BIAcore all'equilibrio dell'Esempio 3. I 15 pHLA irrilevanti sono stati raggruppati in tre gruppi e caricati su una delle tre celle a flusso, per dare approssimativamente 1000 RU di ciascun pHLA per cella a flusso. 20 μ L di TCR di tipo selvatico solubile sono stati iniettati a concentrazioni di 73 μ M su tutte le celle a flusso a una velocità di 20 μ L/min. Nessun legame significativo è stato rilevato a nessuna delle due concentrazioni indicando che il TCR nativo è specifico per il complesso di GVDGREHTV-HLA-A*02.

Questi dati indicano che questo TCR si lega al bersaglio con un'affinità e una specificità adeguate e quindi fornisce un'utile sequenza di partenza per TCR terapeutici.

Esempio 5 - Caratterizzazione di legame di TCR mutati solubili e molecole di ImmTAC dell'invenzione

TCR mutati solubili e molecole di ImmTAC sono stati prodotti sulla base delle sequenze fornite nella Figura 2. I campioni sono stati preparati come descritto negli Esempi 1 e 2 e le caratteristiche di legame determinate secondo l'Esempio 3.

Risultati

Una singola mutazione puntiforme da cisteina a valina in posizione 19 della catena alfa (SEQ ID NO: 6) è stata riscontrata migliorare la resa di ripiegamento e purificazione senza influenzare affinità o specificità (la K_D è stata registrata come 145 μ M e non è stata osservata alcuna reattività incrociata allo stesso pannello di 15 complessi di peptide-HLA alternativi che sono stati testati con il WT).

Sono state identificate catene di TCR alfa e/o beta che hanno contenuto mutazioni in almeno una regione di CDR rispetto alle sequenze di CDR mostrate in Figura 2 (SEQ ID NO: 4 e 5). Queste sequenze di TCR hanno riconosciuto il complesso di GYDGREHTV HLA-A*02 con un'affinità e/o un'emivita particolarmente adatte. In alcuni casi sono state identificate ulteriori mutazioni che hanno migliorato la stabilità e/o la resa del TCR, inclusa la mutazione della catena alfa K1A (con riferimento alla numerazione di SEQ ID NO: 4). Le sequenze amminoacidiche di alcune regioni variabili di catena alfa e beta di TCR mutate dell'invenzione sono fornite rispettivamente nelle Figure 4 e 5. La tabella seguente fornisce caratteristiche di legame per TCR solubili o molecole di ImmTAC (molecole di fusione di TCR solubile-anti-CD3)

comprendenti le regioni variabili alfa e beta indicate.

(Tabella 9)

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	Formato (TCR solubile o ImmTAC)	Metodo (Biacore / Octet)	Parametri di legame	
				KD	T _{1/2}
WTc19v (16)	b1 (25)	TCR solubile	Biacore	330 nM	>2 min
a7 (17)	b1 (25)	TCR solubile	Octet	nd	24 min
a12 (18)	b1 (25)	TCR solubile	Octet	nd	24 min
a13 (19)	b1 (25)	TCR solubile	Octet	nd	144 min
a19 (21)	b1 (25)	TCR solubile	Octet	nd	7,2 ore
WTc19v (16)	b14 (26)	TCR solubile	Octet	nd	10 min
WTc19v (16)	b21 (28)	TCR solubile	Octet	nd	23 min
a13 (19)	b21 (28)	TCR solubile	Biacore	nd	13 ore
a13 (19)	b14 (26)	TCR solubile	Octet	nd	4,1 ore

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	Formato (TCR solubile o ImmTAC)	Metodo (Biacore / Octet)	Parametri di legame	
				KD	T _{1/2}
WTc19v (16)	b1 (25)	TCR solubile	Biacore	330 nM	>2 min
a19 (21)	b14 (26)	TCR solubile	Octet	nd	9,1 ore
a7 (17)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	155 pM	5,4 ore
a19ka (22)	b1 (25)	ImmTAC	Octet	159 pM	4,5 ore
a19ka (22)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	53 pM	16,9 ore
a13ka (20)	b21 (28)	ImmTAC ^a	Biacore	58,6 pM	13,8 ore
a19ka (22)	b14 (26)	ImmTAC ^b	Biacore	32,3 pM	27,6 ore
a19ka (22)	b14L (27)	ImmTAC ^c	Octet	75,1 pM	13,7 ore
a13kaLQ (24)	b21L (29)	ImmTAC ^d	Biacore	74 pM	15,6 ore

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	Formato (TCR solubile o ImmTAC)	Metodo (Biacore / Octet)	Parametri di legame	
				KD	T _{1/2}
WTc19v (16)	b1 (25)	TCR solubile	Biacore	330 nM	>2 min
a13kaLS (23)	b21L (29)	ImmTAC ^e	Biacore	62,6 pM	8,9 ore

nd = non determinato

^a Corrisponde a ImmTAC3 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 44 rispettivamente. Valori basati su una media di 7 misurazioni indipendenti

^b Corrisponde a ImmTAC1 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 42 rispettivamente. Valori basati su una media di 7 misurazioni indipendenti

^c Corrisponde a ImmTAC2 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 43 rispettivamente.

^d Corrisponde a ImmTAC4 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 40 e SEQ ID NO: 45 rispettivamente. Valori basati su una media di 4 misurazioni indipendenti

^e Corrisponde a ImmTAC5 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 41 e SEQ ID NO: 45 rispettivamente.

Ulteriori combinazioni di regioni variabili alfa e beta contenenti mutazioni dell'invenzione sono state testate per il legame al complesso di GVYDGREHTV HLA-A*02. I dati presentati nella tabella seguente sono stati ottenuti utilizzando Biacore, come descritto sopra. Le sequenze di dominio variabile alfa e beta indicate sono state preparate come molecole ImmTAC. Le seguenti combinazioni di rispettivi domini variabili di catena alfa e beta non rientrano nell'ambito di tutela dell'invenzione: (i) SEQ ID NO: 62; e SEQ ID NO: 5; (ii) SEQ ID NO: 63; e SEQ ID NO: 5; (iii) SEQ ID NO: 64; e SEQ ID NO: 5; (iv) SEQ ID NO: 61; e SEQ ID NO: 80; e (v) SEQ ID NO: 61; e SEQ ID NO: 81.

(Tabella 10)

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	KD	T1/2
a36 (SEQ ID NO: 46)	b21L (SEQ ID NO: 29)	210 pM	9,2 ore
a37 (SEQ ID NO: 47)	b21L (SEQ ID NO: 29)	24 pM	47,0 ore
a38 (SEQ ID NO 48)	b21 (SEQ ID NO: 29)	233 pM	10,0 ore
a39 (SEQ ID NO: 49)	b21 (SEQ ID NO: 29)	3013 pM	0,6 ore
a40 (SEQ ID NO: 50)	b21 (SEQ ID NO: 29)	176 pM	4,5 ore
a41 (SEQ ID NO: 51)	b21 (SEQ ID NO: 29)	429 pM	2,7 ore
a13ka (SEQ ID NO: 20)	b41 (SEQ ID NO: 65)	45 pM	25,1 ore
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b42 (SEQ ID NO: 66)	424 pM	2,1 ore
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b43 (SEQ ID NO: 67)	150 pM	8,0 ore
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b44 (SEQ ID NO: 68)	132 pM	9,0 ore

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	KD	T1/2
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b45 (SEQ ID NO: 69)	704 pM	1,9 ore
a13kaLQ (SEQ ID NO: 24)	b46 (SEQ ID NO: 70)	1913 pM	0,9 ore
a30 (SEQ ID NO: 52)	b14 (SEQ ID NO: 26)	103 pM	17 ore
a42 (SEQ ID NO: 53)	b14 (SEQ ID NO: 26)	21 pM	46,4 ore
a31 (SEQ ID NO: 54)	b14 (SEQ ID NO: 26)	182 pM	9 ore
a43 (SEQ ID NO: 55)	b14 (SEQ ID NO: 26)	258 pM	6,0 ore
a32 (SEQ ID NO: 56)	b14 (SEQ ID NO: 26)	179 pM	12 ore
a44 (SEQ ID NO: 57)	b14 (SEQ ID NO: 26)	88 pM	19,0 ore
a33 (SEQ ID NO: 58)	b14 (SEQ ID NO: 26)	947 pM	1,2 ore
a45 (SEQ ID NO: 59)	b14 (SEQ ID NO: 26)	74 pM	11,8 ore
a34 (SEQ ID NO: 60)	b14 (SEQ ID NO: 26)	167 pM	8,7 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b32 (SEQ ID NO: 71)	37,0 pM	30,9 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b33 (SEQ ID NO: 72)	33 pM	35,9 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b34 (SEQ ID NO: 73)	54 pM	21,2 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b35 (SEQ ID NO: 74)	28 pM	37,4 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b36 (SEQ ID NO: 75)	11 pM	58 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b37 (SEQ ID NO: 76)	47 pM	24,9 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b38 (SEQ ID NO: 77)	597 pM	2,3 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b39 (SEQ ID NO: 78)	923 pM	1,1 ore
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b40 (SEQ ID NO: 79)	143 pM	7,9 ore

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena beta (SEQ ID NO)	KD	T1/2
aM50L (SEQ ID NO: 62)	bWT (SEQ ID NO: 5)	31,3 μ M	nd
aS95A (SEQ ID NO: 63)	bWT (SEQ ID NO: 5)	3,5 μ M	nd
aS98L (SEQ ID NO: 64)	bWT (SEQ ID NO: 5)	39,1 μ M	nd
aWTka (SEQ ID NO: 61)	bL96D (SEQ ID NO: 80)	71,4 μ M	nd
aWTka (SEQ ID NO: 61)	bM97Q (SEQ ID NO: 81)	27,5 μ M	nd
nd - non determinato			

I dati presentati nelle tabelle 9 e 10 indicano che alcune sequenze variabili di TCR dell'invenzione hanno un'elevata affinità di legame e una lunga emivita per il complesso di GVDGREHTV HLA-A*02, e sono quindi particolarmente adatte per l'uso come reagenti terapeutici solubili.

Oltre al legame del complesso di GVDGREHTV HLA-A*02 affine, i TCR dell'invenzione sono stati anche valutati per il legame a peptidi simili derivati da MAGE A8 e MAGE B2 e presentati da HLA-A*02. I numeri nella tabella seguente forniscono dati di legame di Biacore per tre molecole di ImmTAC comprendenti le sequenze di dominio variabile alfa e beta indicate. Tutte e tre le molecole di ImmTAC riconoscono il peptide di MAGE-A8 a un livello simile al peptide affine e il peptide di MAGE-B2 a un livello più debole.

(Tabella 11)

Catena alfa (SEQ ID NO)	Catena 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 ore	468 pM	7,7 ore
a13ka (20)	b21 (28) ^b	99,2 pM	8,7 ore	847 pM	4,2 ore
a13kaLQ (24)	b21L (29) ^c	155 pM	9,6 ore	1532 pM	3,27 ore

^a Corrisponde a ImmTAC1 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 42 rispettivamente.

^b Corrisponde a ImmTAC3 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 44 rispettivamente.

^c Corrisponde a ImmTAC4 dall'esempio 6, le sequenze di catena alfa e beta complete sono fornite da SEQ ID NO: 40 e SEQ ID NO: 45 rispettivamente.

Esempio 6 - Reindirizzamento potente e specifico di cellule T da parte di molecole ImmTAC

Molecole di ImmTAC contenenti sequenze di catena variabile alfa e beta mutate con un'affinità particolarmente elevata per l'antigene bersaglio sono state testate per la loro capacità di mediare un

reindirizzamento potente e specifico di cellule T CD3+ mediante saggio ELISPOT, utilizzando la secrezione di interferone- γ (IFN- γ) come lettura fuori per l'attivazione di cellule T.

In questo esempio, la sequenza della regione variabile di catena alfa è stata selezionata da SEQ ID NO: 20-24, e la sequenza della regione variabile di catena beta è stata selezionata da SEQ ID NO: 26-29. Le sequenze di dominio variabile sono state fuse con le rispettive sequenze di dominio extracellulare alfa o beta e hanno contenuto un legame disolfuro non nativo. In ogni caso la catena beta è stata fusa tramite un linker a un scFv di anti-CD3; il linker è stato selezionato da SEQ ID NO: 30-37. Le sequenze complete delle molecole di ImmTAC testate sono fornite dalle SEQ ID NO riportate nella tabella seguente:

(Tabella 12)

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

Metodo

I saggi sono stati eseguiti utilizzando un kit di IFN- γ umano ELISPOT (BD Biosciences). Le cellule bersaglio sono state preparate a una densità di 1×10^6 /ml nel terreno di saggio (RPMI 1640 contenente

FBS inattivato al calore al 10% e penicillina-streptomina-L-glutamina all'1%) e piastrate a 50.000 cellule per pozzetto in un volume di 50 µl. Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), isolate dal sangue fresco di donatore, sono state utilizzate come cellule effettrici e piastrate a 10.000 - 50.000 cellule per pozzetto in un volume di 50 µl (il numero esatto di cellule utilizzate per ciascun esperimento è dipendente dal donatore e può essere regolato per produrre una risposta all'interno di un intervallo adatto per il saggio). Sono state utilizzate concentrazioni variabili di ImmTAC, che coprono l'intervallo clinicamente rilevante previsto, e sono state aggiunte al pozzetto in un volume di 50 µl.

Le piastre sono state preparate secondo le istruzioni del produttore. Cellule bersaglio, cellule effettrici e molecole di ImmTAC sono state aggiunte ai pozzetti rilevanti e portate a un volume finale di 200 µl con il terreno di saggio. Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato. Pozzetti di controllo sono stati preparati anche con l'omissione di ImmTAC, cellule effettrici o cellule bersaglio. Le piastre sono state quindi incubate per una notte (37 °C/CO₂ al 5%). Il giorno successivo le piastre sono state lavate tre volte con tampone di lavaggio (bustina 1xPBS, contenente P20 allo 0,05%, costituito in acqua deionizzata). L'anticorpo di rilevamento primario è stato quindi aggiunto a ciascun pozzetto in un volume di 50 µl. Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 2 ore prima di essere nuovamente lavate tre volte. Il rilevamento secondario è stato eseguito aggiungendo 50 µl di streptavidina-HRP diluita a ciascun pozzetto e incubando a temperatura ambiente per 1 ora e il passaggio di lavaggio ripetuto. Non più di 15 minuti prima dell'uso,

una goccia (20 μ l) di cromogeno AEC è stata aggiunta a ogni 1 ml di substrato AEC e miscelata e 50 μ l sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Lo sviluppo di macchie è stato monitorato regolarmente e le piastre sono state lavate in acqua di rubinetto per terminare la reazione di sviluppo. Le piastre sono state quindi lasciate asciugare a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di contare le macchie utilizzando un analizzatore CTL con software Immunospot (Cellular Technology Limited).

Risultati

I dati presentati nelle Figure 7 e 8, pannelli superiori, mostrano che le molecole di ImmTAC 1-2 e 3-5 rispettivamente sono in grado di mediare il potente reindirizzamento di cellule T (cioè EC_{50} inferiore a 100 pM) contro cellule di cancro che esprimono l'antigene bersaglio (NCI-H1703 - linea cellulare di cancro del polmone umano). Nessuna attivazione di cellule T è stata rilevata contro cellule di cancro negative per antigene (linea cellulare di adenocarcinoma papillare umano NCI-H441 per molecole di ImmTAC 1-2 e linea cellulare di carcinoma mammario umano CAMA-1 per molecole di ImmTAC 3-5), all'interno dell'intervallo di concentrazione clinicamente rilevante (≤ 1 nM), dimostrando che la risposta è specifica.

Le molecole di ImmTAC sono state testate per la specificità utilizzando cellule derivate da tessuti umani normali sani come cellule bersaglio. Il pannello inferiore in Figura 7 dimostra che le molecole di ImmTAC 1-2 hanno una reattività minima a una concentrazione clinica rilevante contro cellule vascolari di pelle umane. Allo stesso modo, i pannelli inferiori in Figura 8 dimostrano che le molecole di ImmTAC 3-5

hanno una reattività minima a una concentrazione clinica rilevante contro cellule vascolari di pelle umane e cellule renali umane.

Le molecole di ImmTAC 1 e 3 sono state ulteriormente testate per specificità contro un pannello di cellule umane derivate da tessuti sani normali utilizzando la stessa metodologia di ELISPOT sopra descritta. I dati presentati in Figura 9 mostrano un'attivazione limitata di cellule T, all'interno di un intervallo di concentrazione clinica rilevante (≤ 1 nM), per tessuti sani, inclusi vasi sanguigni cutanei, cardiaci, scheletrici, epatici e polmonari.

Le molecole di ImmTAC 1 e 4 sono state in aggiunta testate per la reattività contro un pannello esteso di >10 tipi cellulari normali, utilizzando la stessa metodologia di ELISPOT descritta sopra e con un intervallo più fine di concentrazioni di ImmTAC (0,01 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,3 nM, 0,5 nM e 1 nM). La Figura 10 mostra dati rappresentativi ottenuti da cellule scheletriche, cardiache e renali. In ogni caso, le cellule positive per antigene (NCI-H1703) e le cellule negative per antigene (NCI-H441) sono state incluse come controlli. I dati dimostrano una reattività trascurabile contro cellule normali, rispetto a cellule positive per antigene, all'interno di un intervallo di concentrazione clinicamente rilevante (≤ 1 nM).

Questi dati indicano che queste molecole di ImmTAC dimostrano un alto livello di potenza e specificità e sono quindi particolarmente adatte per un uso terapeutico.

Esempio 7 - Uccisione potente di cellule tumorali da parte di cellule T reindirizzate da ImmTAC

La capacità di molecole di ImmTAC dell'invenzione di mediare una potente uccisione di cellule tumorali da parte di cellule T reindirizzate di cellule tumorali positive per antigene è stata studiata utilizzando la piattaforma IncuCyte (Essen BioScience). Questo saggio consente il rilevamento in tempo reale mediante microscopia del rilascio di Caspasi-3/7, un marcatore per l'apoptosi.

Metodo

I saggi sono stati eseguiti utilizzando il kit di saggio di apoptosi di Caspasi-3/7 CellPlayer a 96 pozzetti (Essen BioScience, Cat. N. 4440) ed eseguiti secondo il protocollo del produttore. In breve, le cellule bersaglio (NCI-H1703 - antigene ^{+ve} HLA A*02^{+ve} e NCI-H441 - antigene ^{-ve} HLA A*02^{+ve}) sono state piastrate a 5.000 cellule per pozzetto e incubate per una notte per consentire loro di aderire. Le soluzioni di ImmTAC sono state preparate a concentrazioni comprese tra 0,5 nM e 0,01 nM e 25 µl di ciascuna concentrazione sono stati aggiunti al pozzetto rilevante. Le cellule effettrici sono state utilizzate a un rapporto di cellule effettrici bersaglio di 10:1 (50000 cellule per pozzetto). È stato anche preparato un campione di controllo senza ImmTAC. Il reagente di saggio NucView è stato preparato a 30 µM e 25 µl sono stati aggiunti a ogni pozzetto e il volume finale è stato portato a 150 µl (dando una concentrazione finale di 5 µM). La piastra è stata inserita nello strumento IncuCyte e le immagini sono state acquisite ogni 2 ore (1 immagine per pozzetto) per 3 giorni. Il numero di cellule apoptotiche in ciascuna immagine è stato determinato e registrato come cellule apoptotiche per mm². I saggi sono stati eseguiti in triplicato.

Risultati

I dati presentati nella Figura 11 mostrano l'uccisione in tempo reale di cellule tumorali da parte delle cellule T reindirizzate da ImmTAC. I risultati sono presentati per ImmTAC1 e ImmTAC4. Entrambe le molecole di ImmTAC mostrano un'uccisione reindirizzata da cellule T di cellule tumorali positive per antigene a una concentrazione di 0,01 nM. Non viene osservata alcuna uccisione di cellule negative per antigene anche alla concentrazione più alta (0,5 nM).

Questi dati confermano che ImmTAC1 e ImmTAC4 mediano una potente uccisione di cellule T reindirizzate di cellule tumorali positive per antigene.

RIVENDICAZIONI

1. Recettore di cellule T (TCR) avente la proprietà di legarsi a complesso di GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02 e comprendente un dominio variabile di catena alfa di TCR e un dominio variabile di catena beta di TCR, in cui:

(a) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(b) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 25;

(c) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(d) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(e) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(f) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27;

(g) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(h) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(i) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 46; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(j) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 47; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(k) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 48; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(l) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(m) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 50; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(n) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 51; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(o) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 65;

(p) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 66;

(q) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 67;

(r) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 68;

(s) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 69;

(t) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 70;

(u) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 52; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(v) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 53; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(w) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 54; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(x) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 55; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 26;

(y) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 56; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(z) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 57; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(aa) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 58; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(bb) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 59; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(cc) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 60; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(dd) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 71;

(ee) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 72;

(ff) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 73;

(gg) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 74;

(hh) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 75;

(ii) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76;

(jj) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77;

(kk) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78; o

(II) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 79.

2. TCR come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29.

3. TCR come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26.

4. TCR come rivendicato nella rivendicazione 1, che è

(a) un eterodimero alfa-beta, avente una sequenza di dominio costante TRAC di catena alfa e una sequenza di dominio costante TRBC1 o TRBC2 di catena beta, o

(b) in formato a singola catena del tipo $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$, $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$,

in cui $V\alpha$ e $V\beta$ sono rispettivamente regioni variabili di TCR α e β , $C\alpha$ e $C\beta$ sono regioni costanti di TCR α e β rispettivamente e L è una sequenza di linker.

5. TCR come rivendicato nella rivendicazione 4, che è un

eterodimero alfa-beta, in cui le sequenze di dominio costante di catena alfa e beta sono modificate mediante troncamento o sostituzione per eliminare un legame disolfuro nativo tra Cys4 dell'esone 2 di TRAC e Cys2 dell'esone 2 di TRBC1 o TRBC2, e/o facoltativamente l'una o più sequenze di dominio costante di catena alfa e/o beta sono modificate mediante sostituzione di residui di cisteina con Thr 48 di TRAC e Ser 57 di TRBC1 o TRBC2, dette cisteine formando un legame disolfuro non nativo tra i domini costanti alfa e beta del TCR.

6. TCR come rivendicato in qualsiasi rivendicazione precedente associato a un'etichetta rilevabile, un agente terapeutico o una porzione funzionale modificante la farmacocinetica, facoltativamente in cui un anticorpo anti-CD3 è collegato in modo covalente al C- o N-terminale della catena alfa o beta del TCR, facoltativamente in cui l'anticorpo anti-CD3 è collegato in modo covalente al C- o N-terminale della catena beta del TCR tramite una sequenza di linker, facoltativamente in cui la sequenza di linker è selezionata dal gruppo costituito da 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), e GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37).

7. Molecola di fusione di TCR-anti-CD3 in cui:

(a) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(b) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 25;

(c) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(d) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28;

(e) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(f) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27;

(g) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(h) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(i) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 46; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(j) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 47; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(k) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 48; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(l) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(m) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 50; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(n) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 51; e il dominio variabile di

catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29;

(o) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 65;

(p) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 66;

(q) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 67;

(r) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 68;

(s) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 69;

(t) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID

NO: 70;

(u) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 52; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(v) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 53; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(w) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 54; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(x) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 55; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(y) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 56; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(z) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 57; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(aa) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 58; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(bb) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 59; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(cc) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 60; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26;

(dd) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 71;

(ee) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 72;

(ff) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 73;

(gg) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la

sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 74;

(hh) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 75;

(ii) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76;

(jj) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77;

(kk) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78; o

(ll) il dominio variabile di catena alfa di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e il dominio variabile di catena beta di TCR comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 79, e

in cui l'anticorpo anti-CD3 è collegato in modo covalente all'N-terminale o C-terminale della catena beta di TCR tramite una sequenza

di linker selezionata da SEQ ID NO: 30-37.

8. Molecola di fusione di TCR-anti-CD3 come rivendicato nella rivendicazione 7, comprendente

(a) una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 38 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 42;

(b) una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 38 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 43;

(c) una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 39 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 44;

(d) una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 40 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 45; o

(e) una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 41 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 45.

9. Molecola di fusione di TCR-anti-CD3 come rivendicato nella rivendicazione 7, comprendente una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 40 una sequenza amminoacidica di catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 45.

10. Molecola di fusione di TCR-anti-CD3 come rivendicato nella rivendicazione 7, comprendente una sequenza amminoacidica di catena alfa corrispondente a SEQ ID NO: 38 una sequenza amminoacidica di

catena beta corrispondente a SEQ ID NO: SEQ ID NO: 42.

11. Acido nucleico codificante per una catena alfa di TCR e una catena beta di TCR come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

12. Vettore di espressione comprendente l'acido nucleico della rivendicazione 11.

13. Vettore di espressione come rivendicato nella rivendicazione 12, in cui il vettore comprende una prima cornice di lettura aperta che codifica per la catena alfa di TCR e una seconda cornice di lettura aperta che codifica per la catena beta di TCR.

14. Cellula che ospita

(a) un vettore di espressione come rivendicato nella rivendicazione 12 o 13 codificante per catene alfa e beta di TCR come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in una singola cornice di lettura aperta, o due distinte cornici di lettura aperta; o

(b) un primo vettore di espressione che comprende un acido nucleico codificante per la catena alfa di un TCR come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, e un secondo vettore di espressione che comprende un acido nucleico codificante per la catena beta di un TCR come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10.

15. Cellula non presente in natura, in particolare cellula T, che presenta un TCR come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6.

16. Composizione farmaceutica comprendente un TCR come

rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, molecola di fusione di TCR-anti-CD3 come rivendicato nelle rivendicazioni 7-10, acido nucleico come rivendicato nella rivendicazione 11 e/o cellula come rivendicato nella rivendicazione 14 o nella rivendicazione 15, insieme ad uno o più trasportatori o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

17. TCR di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, molecola di fusione di TCR-anti-CD3 delle rivendicazioni 7-10, acido nucleico della rivendicazione 11, composizione farmaceutica della rivendicazione 16 e/o cellula della rivendicazione 14 o della rivendicazione 15, per l'uso in un medicamento.

18. TCR, molecola di fusione di TCR-anti-CD3, acido nucleico, composizione farmaceutica e/o cellula per l'uso della rivendicazione 17, in cui il TCR, la molecola di fusione di TCR-anti-CD3, l'acido nucleico, la composizione farmaceutica o la cellula è per l'uso in un metodo di trattamento di cancro o un tumore, preferibilmente in un soggetto umano.

19. TCR, molecola di fusione di TCR-anti-CD3, acido nucleico, composizione farmaceutica e/o cellula per l'uso della rivendicazione 18, in cui (i) il soggetto umano ha un tumore che esprime MAGE A4, (ii) il tumore è un tumore solido , (iii) il soggetto umano è del sottotipo HLA-A*02 e/o (iv) il TCR, la molecola di fusione di TCR-anti-CD3, l'acido nucleico, la composizione farmaceutica o la cellula sono somministrati mediante iniezione, come iniezione endovenosa o intratumorale diretta iniezione.

20. Metodo per produrre un TCR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, o una molecola di fusione di TCR-anti-CD3

secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 10, comprendente a) mantenere una cellula secondo la rivendicazione 14 in condizioni ottimali per l'espressione delle catene di TCR e b) isolare le catene di TCR.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 1-18/18

Figure 1-11b

“Figure” = Figura

TAVOLA 1/18

Figura 1

“SEQ ID NO: 2 Amino acid sequence of a native alpha chain extracellular region. The variable region comprises residues 1 - 113. CDRs are underlined and CDR1, 2, 3 are designated SEQ ID NO: 6, 7 and 8, respectively. The FR2 and FR3 regions are in bold and are designated SEQ ID NO: 9 and 10, respectively. The constant region is shown in italics.” = SEQ ID NO: 2 Sequenza amminoacidica di una regione extracellulare di catena alfa nativa. La regione variabile comprende i residui 1 - 113. Le CDR sono sottolineate e CDR1, 2, 3 sono designate SEQ ID NO: 6, 7 e 8, rispettivamente. Le regioni FR2 e FR3 sono in grassetto e sono designate SEQ ID NO: 9 e 10, rispettivamente. La regione costante è mostrata in corsivo.

“SEQ ID NO: 3 Amino acid sequence of a native beta chain extracellular region. The variable region comprises residues 1-116. CDRs are underlined and are designated SEQ ID NO: 11, 12 and 13, respectively. The FR2 and FR3 regions are in bold and are designated SEQ ID NO: 14 and 15, respectively. The constant region is shown in italics.” = SEQ ID NO: 3 Sequenza amminoacidica di una regione extracellulare di catena beta nativa. La regione variabile comprende i residui 1-116. Le CDR sono sottolineate e sono designate SEQ ID NO:

11, 12 e 13, rispettivamente. Le regioni FR2 e FR3 sono in grassetto e sono designate SEQ ID NO: 14 e 15, rispettivamente. La regione costante è mostrata in corsivo.

TAVOLA 2/18

Figura 2

“SEQ ID NO: 4 Amino acid sequence of the soluble extracellular region of a native TCR alpha chain. CDRs are underlined. The constant region is shown in italics and the non-native cysteine residue is shown in bold (at position 48 of constant region).” = SEQ ID NO: 4 Sequenza amminoacidica della regione extracellulare solubile di una catena alfa di TCR nativa. Le CDR sono sottolineate. La regione costante è mostrata in corsivo e il residuo di cisteina non nativo è mostrato in grassetto (in posizione 48 della regione costante).

“SEQ ID NO: 5 Amino acid sequence of the soluble extracellular region of a native TCR beta chain. CDRs are underlined. The constant region is shown in italics and the non-native cysteine residue is shown in bold (at position 57 of constant region). Additional non-native amino acids at position 75 and position 89 of the constant region are also shown in bold.” = SEQ ID NO: 5 Sequenza amminoacidica della regione extracellulare solubile di una catena beta di TCR nativa. Le CDR sono sottolineate. La regione costante è mostrata in corsivo e il residuo di cisteina non nativo è mostrato in grassetto (alla posizione 57 della regione costante). In grassetto sono anche mostrati ulteriori amminoacidi non nativi in posizione 75 e posizione 89 della regione costante.

TAVOLA 3/18

Figura 3

“Amino acid sequences of mutated TCR alpha chain variable regions. CDRs are underlined and mutations are in bold” = Sequenze amminoacidiche di regioni variabili di catena alfa di TCR mutate. Le CDR sono sottolineate e le mutazioni sono in grassetto

“mutant alpha chain” = catena alfa mutante

TAVOLE 4-6/18

Figura 3

“continued” = continua

“mutant alpha chain” = catena alfa mutante

TAVOLA 7/18

Figura 4

“Amino acid sequences of mutated TCR beta chain variable regions. CDRs are underlined and mutations are in bold” = Sequenze amminoacidiche di regioni variabili di catena beta di TCR mutate. Le CDR sono sottolineate e le mutazioni sono in grassetto

“mutant beta chain” = catena beta mutante

TAVOLE 8-9/18

Figura 4

“continued” = continua

“mutant beta chain” = catena beta mutante

TAVOLA 10/18

Figura 5

“Amino acid sequences of alpha chains of TCR anti-CD3 fusion molecules” = Sequenze amminoacidiche di catene alfa di molecole di

fusione di TCR-anti-CD3

“alpha chain” = catena alfa

TAVOLA 11/18

Figura 6

“Amino acid sequences of beta chains of TCR-anti-CD3 fusion molecules” = Sequenze amminoacidiche di catene beta di molecole di fusione di TCR-anti-CD3

“beta chain (*). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics” = catena beta (*). scFv anti-CD3 mostrato in grassetto e linker mostrato in corsivo

TAVOLA 12/18

Figura 6

“continued” = continua

“beta chain (*). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics” = catena beta (*). scFv anti-CD3 mostrato in grassetto e linker mostrato in corsivo

TAVOLA 13/18

Figura 7

“Potent and specific recognition of antigen positive cancer cells by MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules I” = Riconoscimento potente e specifico di cellule di cancro positive per antigene da parte di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3 I

“Antigen positive cancer cells” = Cellule di cancro positive per antigene

“Antigen negative cancer cells” = Cellule di cancro negative per

antigene

“IFN γ release (no. spots, +/- SEM)” = Rilascio di IFN γ (n. di macchie, +/- SEM)

“Controls” = Controlli

“Human skin vasculature cells” = Cellule vascolari di pelle umana

“no reagent” = nessun reagente

TAVOLA 14/18

Figura 8

“Potent and specific recognition of antigen positive cancer cells by MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules II” = Riconoscimento potente e specifico di cellule di cancro positive per antigene da parte di molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3 II

“Antigen positive cancer cells” = Cellule di cancro positive per antigene

“Antigen negative cancer cells” = Cellule di cancro negative per antigene

“IFN γ release (no. spots, +/- SEM)” = Rilascio di IFN γ (n. di macchie, +/- SEM)

“Controls” = Controlli

“Human skin vasculature cells” = Cellule vascolari di pelle umana

“Human kidney cells” = Cellule di rene umane

“no reagent” = nessun reagente

TAVOLA 15/18

Figura 9

“Further specificity tests for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion

molecules I” = Ulteriori test di specificità per molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3 I

“IFN γ release (no. spots, +/- SEM)” = Rilascio di IFN γ (n. di macchie, +/- SEM)

“No reagent” = Nessun reagente

“Antigen positive cancer cells” = Cellule di cancro positive per antigene

“Normal cells” = Cellule normali

TAVOLA 16/18

Figura 10

“Further specificity tests for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules II” = Ulteriori test di specificità per molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3 II

“Skeletal muscle” = Muscolo scheletrico

“Cardiac” = Cardiaco

“Renal” = Renale

“IFN γ release (no. spots, +/- SEM)” = Rilascio di IFN γ (n. di macchie, +/- SEM)

“Normal cell” = Cellula normale

“Antigen positive control” = Controllo positivo per antigene

“Antigen negative control” = Controllo negativo per antigene

TAVOLA 17/18

Figura 11a

“Real-time killing response against antigen positive cells (top panel) and antigen negative cells (bottom panel) for MAGE A4 TCR-anti-CD3

fusion molecules” = Risposta di uccisione in tempo reale contro cellule positive per antigene (pannello superiore) e cellule negative per antigene (pannello inferiore) per molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3

“Apoptotic cells (per mm²)” = Cellule apoptotiche (per mm²)

“No ImmTAC” = Nessun ImmTAC

“Time (hours)” = Tempo (ore)

TAVOLA 18/18

Figura 11b

“Real-time killing response against antigen positive cells (top panel) and antigen negative cells (bottom panel) for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules” = Risposta di uccisione in tempo reale contro cellule positive per antigene (pannello superiore) e cellule negative per antigene (pannello inferiore) per molecole di fusione di TCR di MAGE A4-anti-CD3

“Apoptotic cells (per mm²)” = Cellule apoptotiche (per mm²)

“No ImmTAC” = Nessun ImmTAC

“Time (hours)” = Tempo (ore)

Figure 1

SEQ ID NO: 2 Amino acid sequence of a native alpha chain extracellular region. The variable region comprises residues 1 – 113. CDRs are underlined and CDR1, 2, 3 are designated SEQ ID NO: 6, 7 and 8, respectively. The FR2 and FR3 regions are in bold and are designated SEQ ID NO: 9 and 10, respectively. The constant region is shown in italics.

KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCN~~Y~~TVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSGGSYIPTFGRGTS**LIVHPYIQKPDPAVYQLR**
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA
*NAFNNSIIPEDTFFPSP*ESS

SEQ ID NO: 3 Amino acid sequence of a native beta chain extracellular region. The variable region comprises residues 1-116. CDRs are underlined and are designated SEQ ID NO: 11, 12 and 13, respectively. The FR2 and FR3 regions are in bold and are designated SEQ ID NO: 14 and 15, respectively. The constant region is shown in italics.

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMK**EGDIP**
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFLMTSGDPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNV
FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS~~W~~WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP
*ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP~~R~~NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV*TQIVSAEAWGR
AD

Figure 2

SEQ ID NO: 4 Amino acid sequence of the soluble extracellular region of a native TCR alpha chain. CDRs are underlined. The constant region is shown in italics and the non-native cysteine residue is shown in bold (at position 48 of constant region).

KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCN^YT^VSPF^SNLRWYKQDTGRGPFVSLT^IMT^FSENTKSNGRYT
 ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYIC^VVNHS^GGSYI^PTFGRGTS^LI^VHPY^IQ^KPDPAVY^QLR
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS^VYITDK^CVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP

SEQ ID NO: 5 Amino acid sequence of the soluble extracellular region of a native TCR beta chain. CDRs are underlined. The constant region is shown in italics and the non-native cysteine residue is shown in bold (at position 57 of constant region). Additional non-native amino acids at position 75 and position 89 of the constant region are also shown in bold.

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQ^DMD^HEN^MFWYRQDPGLGLRLIY^FS^YDV^KMKEKGDIP
 EGYSVSREKKERFSLIILEASTN^QTSMYLC^ASSFLMTSGDPYEQ^YFGPGTRLTVT^EDLKNV
FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGV^CTDPQPLKEQPALNDSRY^ALSRRLRVSATFW^QDPRNHFR^CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV^TQIVSAEAWGRAD

Figure 3

Amino acid sequences of mutated TCR alpha chain variable regions. CDRs are underlined and mutations are in bold

SEQ ID NO: 16 mutant alpha chain (c19v).

KNQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT IMT**F**SENTK**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**NHSGGS**Y**IP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 17 mutant alpha chain (a7)

KNQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I**L**D**Y**A**I**N**T**K**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**NHSGGS**Y**IP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 18 mutant alpha chain (a12)

KNQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT IMT**F**SENTK**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**N**R**A**D**G**L**YIP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 19 mutant alpha chain (a13)

KNQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT IMT**F**SENTK**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**N**S**A**N**G**L**YIP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 20 mutant alpha chain (a13ka)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT IMT**F**SENTK**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**N**S**A**N**G**L**YIP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 21 mutant alpha chain (a19)

KNQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I**L**D**Y**A**I**N**T**K**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**N**R**A**D**G**L**YIP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

SEQ ID NO: 22 mutant alpha chain (a19ka)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I**L**D**Y**A**I**N**T**K**S**NGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSAS**Y**ICV**V**N**R**A**D**G**L**YIP**T**FG**R**G**T**SLIVHP

Figure 3 continued

SEQ ID NO: 23 mutant alpha chain (a13kaLS)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSASGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 24 mutant alpha chain (a13kaLQ)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 46 mutant alpha chain (a36)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILMTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 47 mutant alpha chain (a37)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTYSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 48 mutant alpha chain (a38)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 49 mutant alpha chain (a39)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSSQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 50 mutant alpha chain (a40)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAAGGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 51 mutant alpha chain

(a41)ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILLTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGSYIIPTFGRGTS LIVHP

Figure 3 continued

SEQ ID NO: 52 mutant alpha chain (a30)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 53 mutant alpha chain (a42)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 54 mutant alpha chain (a31)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDFAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 55 mutant alpha chain (a43)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYSINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 56 mutant alpha chain (a32)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 57 mutant alpha chain (a44)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~HADGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 58 mutant alpha chain (a33)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RSDGLYIPTFGRGTSLIVHP

SEQ ID NO: 59 mutant alpha chain (a45)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCN~~V~~TVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV~~VN~~RAGGLYIPTFGRGTSLIVHP

Figure 3 continued

SEQ ID NO: 60 mutant alpha chain (a34)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I **LDYAI**NTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV**VN****RAD**GSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 61 mutant alpha chain (aWTka)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I **MTF**SENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV**VN****HSG**GSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 62 mutant alpha chain (aM50L)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I **LT**TFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV**VN****HSG**GSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 63 mutant alpha chain (aS95A)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I **MTF**SENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV**VN****H**AGGSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 64 mutant alpha chain (aS98L)

ANQVEQSPQSLI ILEGK**N**VTLQCN**Y**TVSPF**S**NLRWYKQDTGRGPVSLT I **MTF**SENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV**VN****HSG****LY** IPTFGRGTS LIVHP

Figure 4

Amino acid sequences of mutated TCR beta chain variable regions. CDRs are underlined and mutations are in bold

SEQ ID NO: 25 mutant beta chain (b1)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 26 mutant beta chain (b14)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 27 mutant beta chain (b14L)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKLKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 28 mutant beta chain (b21)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 29 mutant beta chain (b21L)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 65 mutant beta chain (b41)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 66 mutant beta chain (b42)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYFATGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

Figure 4 continued

SEQ ID NO: 67 mutant beta chain (b43)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRDATGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 68 mutant beta chain (b44)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFVTGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 69 mutant beta chain (b45)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFAKGKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 70 mutant beta chain (b46)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 71 mutant beta chain (b32)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 72 mutant beta chain (b33)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDADLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 73 mutant beta chain (b34)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPHSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 74 mutant beta chain (b35)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLEKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

Figure 4 continued

SEQ ID NO: 75 mutant beta chain (b36)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKNMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 76 mutant beta chain (b37)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 77 mutant beta chain (b38)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSLQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 78 mutant beta chain (b39)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDMNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 79 mutant beta chain (b40)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQTSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 80 mutant beta chain (bL96D)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENNMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFDMTSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 81 mutant beta chain (bM97Q)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENNMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFLQTSGDPYEQYFGPGTRLTVT

Figure 5

Amino acid sequences of alpha chains of TCR anti-CD3 fusion molecules

SEQ ID NO: 38 alpha chain (a19ka)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQKPDPAVYQLR
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA
NAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 39 alpha chain (a13ka)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSANGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQKPDPAVYQLR
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA
NAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 40 alpha chain (a13kaLQ)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQKPDPAVYQLR
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA
NAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 41 alpha chain (a13kaLS)

ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRYT
ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSASGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQKPDPAVYQLR
DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA
NAFNNSIIPEDT

Figure 6

Amino acid sequences of beta chains of TCR-anti-CD3 fusion molecules

SEQ ID NO: 42 beta chain (b14). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
 FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGS
 GGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALIN
 PYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWG
 QGTLVTVSSGGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWRQDPGLGLRLIY
 FSYDVKMKEKGDIP EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSDQNSGDPYEQYFG
 PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVH
 SGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA
 KPVTQIVSAEAWGRAD

SEQ ID NO: 43 beta chain (b14L). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
 FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGS
 GGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALIN
 PYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWG
 QGTLVTVSSGGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWRQDPGLGLRLIY
 FSYDVKLKEKGDIP EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSDQNSGDPYEQYFG
 PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVH
 SGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA
 KPVTQIVSAEAWGRAD

Figure 6 continued

SEQ ID NO: 44 beta chain (b21). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWY**QQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR**
FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGS
GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY**SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALIN**
PYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS**GGYGDSDWYFDVWG**
QGT*LVTVSSGGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIY*
*FSRFATGKEKGDIP*EGYSVSREKKERFSLI**LESASTNQTSMYLCASSDQNSGDPYEQYFG**
*PGTRLTVT**EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELS*WWVNGKEVH
*SGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRV*SATFWQDPRNH**FRCQVQFYGLSENDEWTQDRA**
KPVTQIVSAEAWGRAD

SEQ ID NO: 45 beta chain (b21L). Anti-CD3 scFv shown in bold and linker shown in italics

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWY**QQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR**
FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGS
GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY**SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALIN**
PYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS**GGYGDSDWYFDVWG**
QGT*LVTVSSGGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDL*DHENMFWYRQDPGLGLRLIY
*FSRFATGKEKGDIP*EGYSVSREKKERFSLI**LESASTNQTSMYLCASSDQNSGDPYEQYFG**
*PGTRLTVT**EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELS*WWVNGKEVH
*SGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRV*SATFWQDPRNH**FRCQVQFYGLSENDEWTQDRA**
KPVTQIVSAEAWGRAD

Figure 7

Potent and specific recognition of antigen positive cancer cells by MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules I

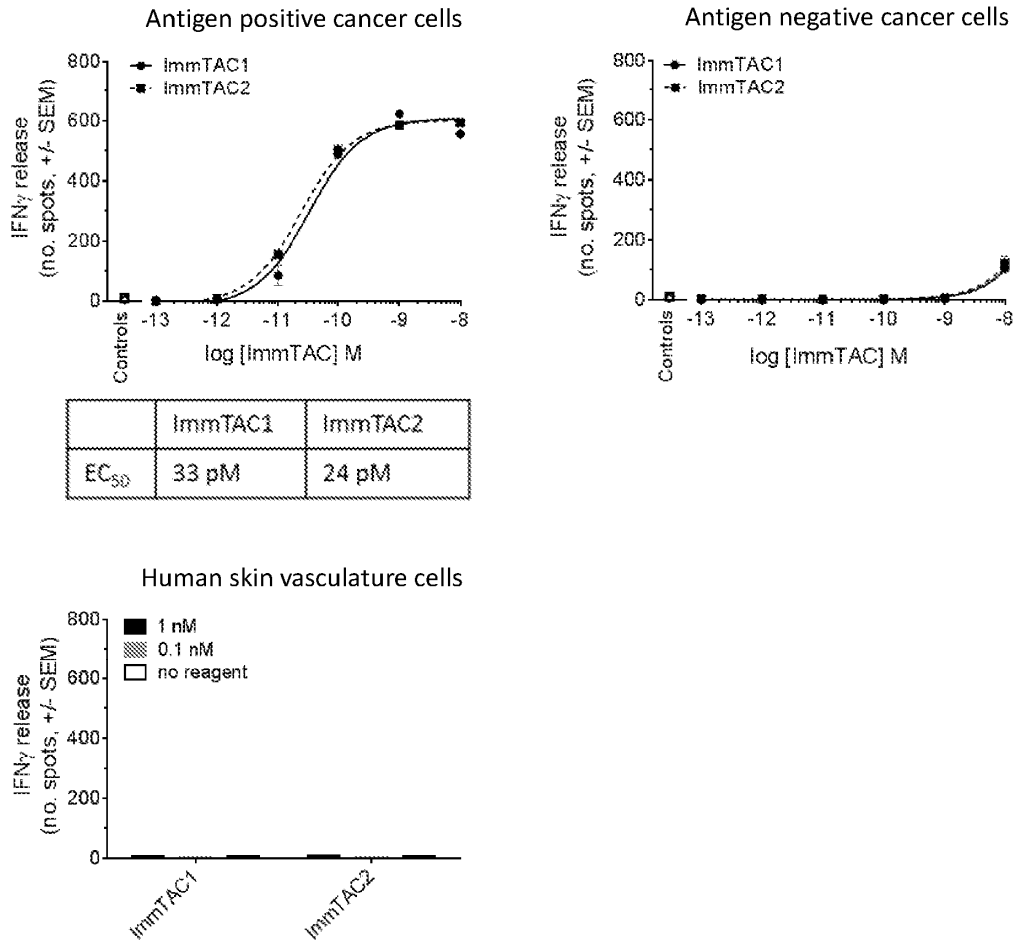


Figure 8

Potent and specific recognition of antigen positive cancer cells by MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules II

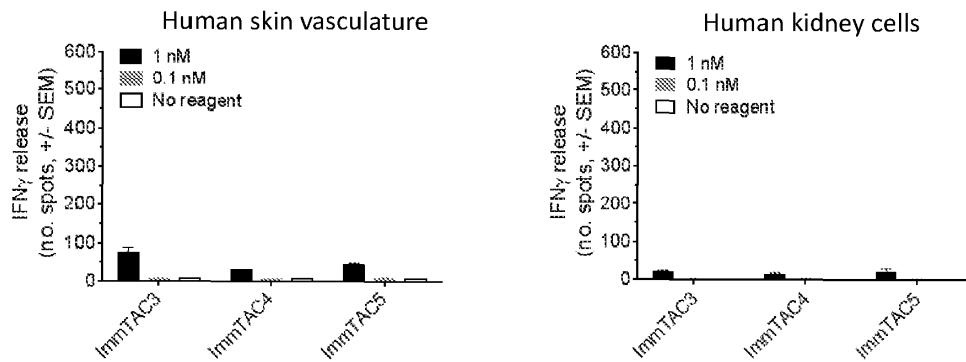
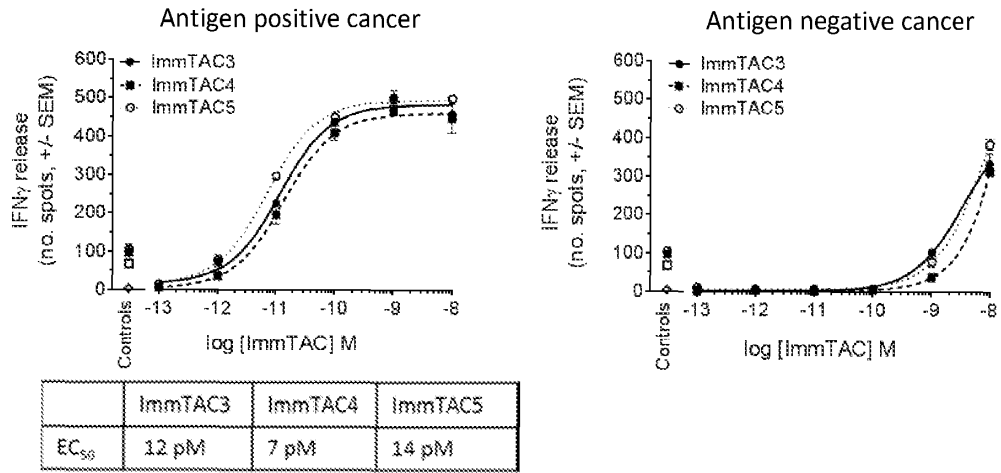


Figure 9

Further specificity tests for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules I

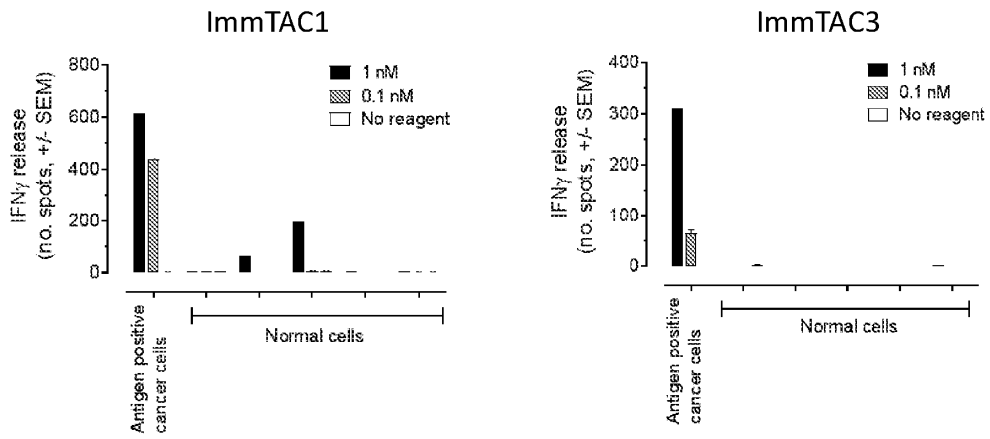


Figure 10

Further specificity tests for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules II

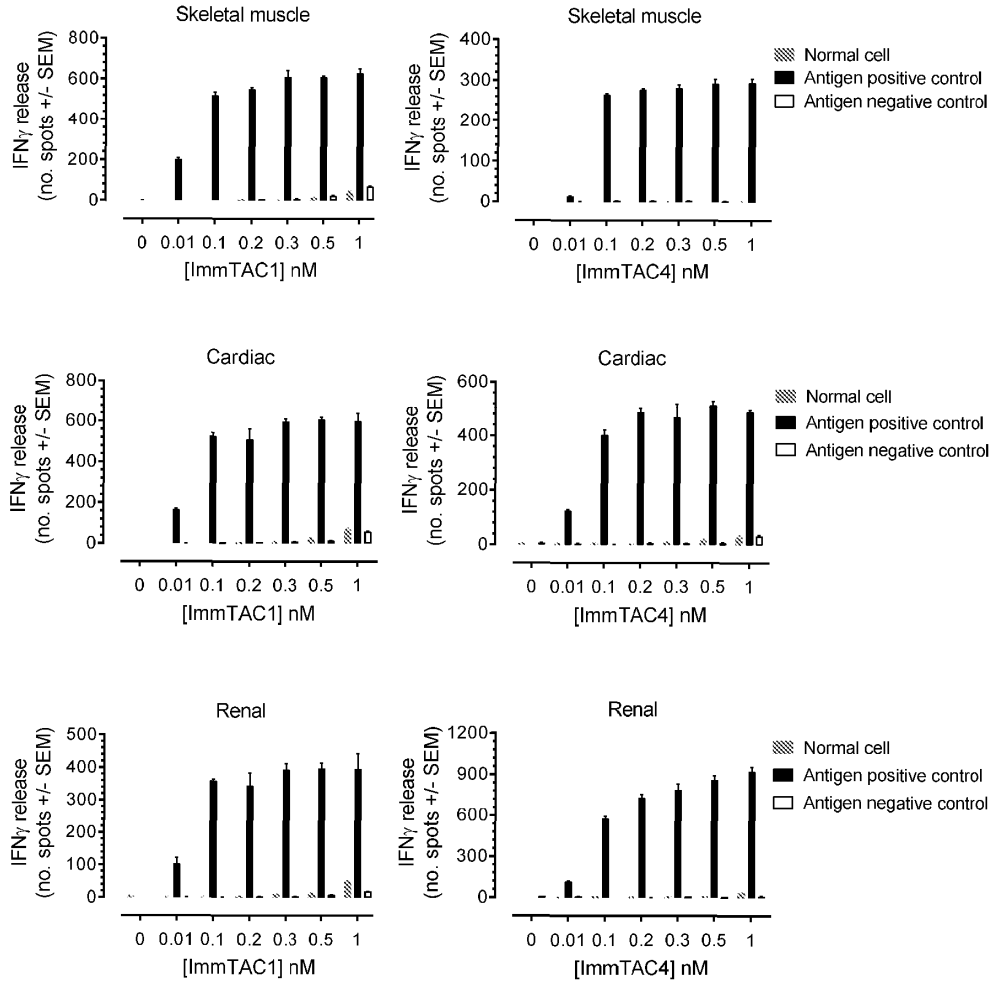


Figure 11a

Real-time killing response against antigen positive cells (top panel) and antigen negative cells (bottom panel) for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules

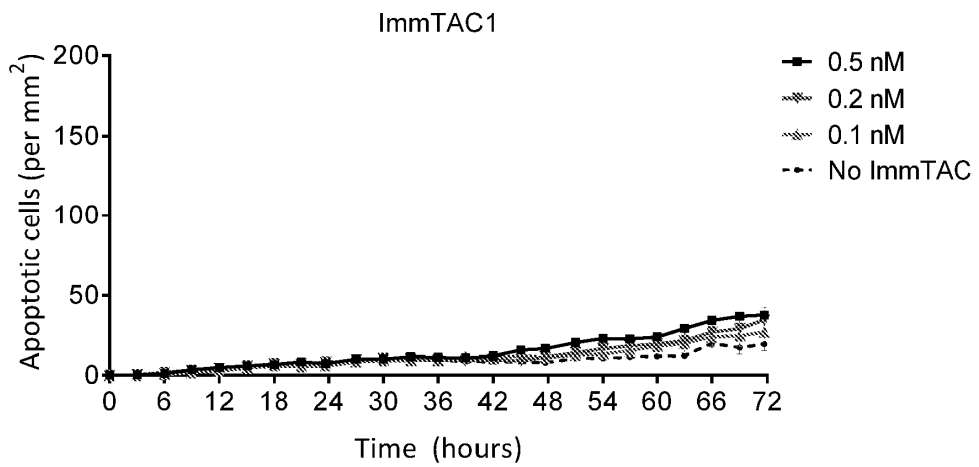
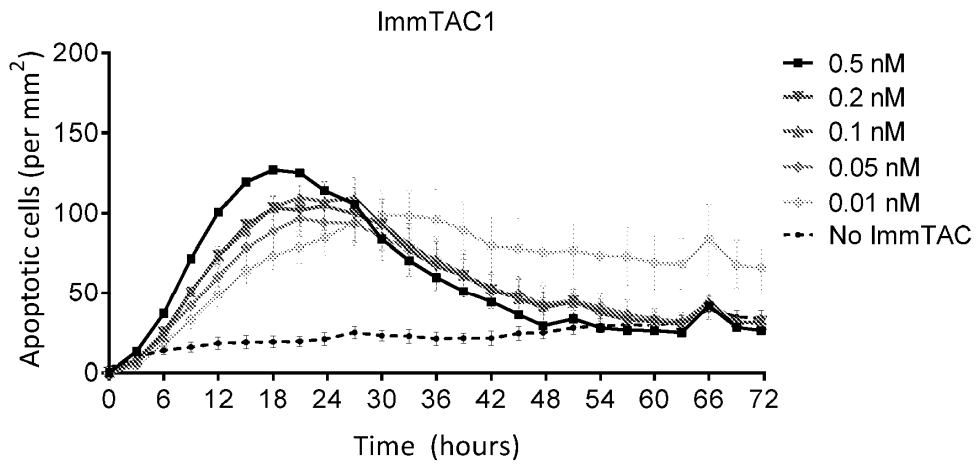


Figure 11b

Real-time killing response against antigen positive cells (top panel) and antigen negative cells (bottom panel) for MAGE A4 TCR-anti-CD3 fusion molecules

