



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 229**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03811009 .4**
96 Fecha de presentación : **30.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1558643**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Presentación del receptor de linfocitos T.**

30 Prioridad: **09.11.2002 GB 0226227**
25.01.2003 GB 0301814
22.02.2003 GB 0304067
16.04.2003 US 463046 P
16.05.2003 GB 0311397
11.07.2003 GB 0316356

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2009

73 Titular/es: **Immunocore Ltd.**
57C Milton Park
Abingdon, Oxford OX14 4RX, GB

72 Inventor/es: **Jakobsen, Bent, Karsten;**
Andersen, Torben, Bent;
Molloy, Peter, Eamon;
Li, Yi y
Boulter, Jonathan, Michael

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 327 229 T3

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

DESCRIPCIÓN

Presentación del receptor de linfocitos T.

5 La presente invención se refiere a partículas proteináceas, por ejemplo partículas de fago o de ribosoma, que presentan receptores de células T (TCR) y diversas bibliotecas de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 *TCR nativos*

Como se describe en, por ejemplo, el documento WO99/60120, los TCR median el reconocimiento de complejos péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y, como tales, son esenciales para el funcionamiento de la rama celular del sistema inmunitario.

15 Los anticuerpos y los TCR son los únicos dos tipos de moléculas que reconocen los antígenos de un modo específico y, por tanto, el TCR es el único receptor para antígenos peptídicos concretos presentados en el MHC, a menudo siendo el péptido extraño el único signo de anomalía dentro de una célula. El reconocimiento de las células T se produce cuando una célula T y una célula presentadora de antígeno (CPA) están en contacto físico directo y se inicia mediante la unión de los TCR específicos del antígeno con los complejos pMHC.

20 El TCR nativo es una proteína heterodimérica de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas que está asociada con proteínas invariables del complejo CD3 implicado en la mediación de la transducción de la señal. Los TCR existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que son estructuralmente similares pero tienen localizaciones anatómicas, y probablemente funciones, distintas. Los ligandos de clase I y clase II del MHC también son proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, pero están especializadas en la presentación del antígeno, con un sitio de unión peptídica altamente polimórfico que les permite presentar una gran diversidad de fragmentos peptídicos cortos en la superficie celular de las CPA.

30 Se sabe que otras dos clases de proteínas son capaces de funcionar como ligandos de los TCR. (1) los antígenos CD1 son moléculas relacionadas con el MHC de clase I cuyos genes se localizan en un cromosoma distinto al de los antígenos de clase I y clase II del MHC típicos. Las moléculas CD1 son capaces de presentar restos peptídicos y no peptídicos (p. ej., lípidos, glicolípidos) a las células T de un modo análogo al de los complejos péptido-MHC de clase I y de clase II convencionales. Véase, por ejemplo, (Barclay y col, (1997) The Leucocyte Antigen Factsbook 2 nd Edition, Academic Press) y (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373) (2) los superantígenos bacterianos son toxinas solubles que son capaces de unirse tanto a las moléculas del MHC de clase II como a una subpoblación de TCR (Fraser (1989) Nature 339 221-223). Muchos antígenos exhiben especificidad por uno o dos segmentos Vbeta, mientras que otros exhiben una unión más promiscua. En cualquier caso, los superantígenos son capaces de provocar una respuesta inmunitaria potenciada en virtud de su capacidad para estimular subpoblaciones de células T de un modo policlonal.

45 La porción extracelular de los TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ heterodiméricos nativos consta de dos polipéptidos, cada uno de los cuales posee un dominio constante cerca de la membrana y un dominio variable lejos de la membrana. Cada uno de los dominios constante y variable incluye un puente disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. La CDR3 de los TCR $\alpha\beta$ interacciona con el péptido presentado por el MHC, y las CDR3 1 y 2 de los TCR $\alpha\beta$ interactúan con el péptido y con el MHC. La diversidad de las secuencias del TCR se genera a través de la reorganización somática de los genes ligados de las regiones variables (V), diversidad (D), de acoplamiento (J) y constantes.

50 Los polipéptidos funcionales de las cadenas α Y γ están formados por regiones V-J-C reorganizadas, mientras que las cadenas β y δ están compuestas por regiones V-D-J-C. El dominio constante extracelular tiene una región proximal a la membrana y una región de inmunoglobulina. Existen dominios constantes de cadena sencilla α y δ , conocidos como TRAC y TRDC, respectivamente. El dominio constante de la cadena β está compuesto por uno de dos dominios constantes β diferentes, conocidos por TRBC1 y TRBC2 (nomenclatura del IMGT) Entre estos dominios constantes de β hay cuatro cambios aminoacídicos, tres de los cuales están dentro de los dominios usados para producir los TCR de cadena sencilla que se presentan en las partículas de fago de la presente invención. Todos estos cambios están dentro del exón 1 de TRBC1 y TRBC2: N4K5->K4N5 y F37->Y (numeración del IMGT, diferencias TRBC1->TRBC2), mientras que el cambio del aminoácido final entre las dos regiones constantes de la cadena β del tCR está en el exón 3 de TRBC1 y TRBC2: V1->E. El dominio constante de γ está compuesto por uno de TRGC1, TRGC2(2x) o TRGC2(3x). Los dos dominios constantes TRGC2 sólo difieren en el número de copias presentes de los aminoácidos codificados por el exón 2 de este gen.

65 La extensión de cada uno de los dominios extracelulares del TCR es algo variable. No obstante, un experto en la técnica puede determinar con facilidad la posición de los límites del dominio usando una referencia tal como The T Cell Receptor Facts Book, Lefranc & Lefranc, Publ Academic Press 2001.

TCR recombinantes

La producción de TCR recombinantes es beneficiosa porque proporcionan análogos solubles de TCR adecuados para los propósitos siguientes:

- Estudiar las interacciones TCR/Ligando (p. ej., pMHC por TCR $\alpha\beta$)
- Detección selectiva de inhibidores de interacciones asociadas con TCR
- Proporcionar la base de posibles terapéuticas

Hasta la fecha, se han concebido una serie de constructos para la producción de TCR recombinantes. Estos constructos caen dentro de dos clases amplias, TCR de cadena sencilla y TCR diméricos, la literatura relevante de estos constructos se resume más adelante.

Los TCR de cadena sencilla (scTCR) son constructos artificiales compuestos por una hebra sencilla de aminoácidos, que, como los TCR heterodiméricos nativos, se unen a complejos MHC-péptido. Por desgracia, los intentos de reducir TCR funcionales análogos de alfa/beta simplemente uniendo las cadenas alfa y beta de modo que se expresen ambas en un único marco de lectura abierto no han tenido éxito, probablemente por la inestabilidad natural del apareamiento del dominio soluble alfa-beta.

En consecuencia, para la producción de scTCR han sido necesarias técnicas especiales usando diversas fragmentaciones de una de las cadenas alfa y beta o de ambas. Estos formatos parecen ser aplicables únicamente a una gama muy limitada de secuencias de scTCR. Soo Hoo y col (1992) PNAS. 89 (10): 4759-63 comunican la expresión de un TCR de ratón en formato de cadena sencilla en el clon de células T 2C usando una cadena alfa y beta truncada unida con un espaciador de 25 aminoácidos y expresión periplásmica bacteriana (véase también Schodin y col (1996) Mol. Immunol. 33 (9): 819-29). Este diseño también forma la base del TCR de cadena sencilla m6 comunicado por Holler y col. (2000) PNAS. 97 (10): 5387-92, que deriva del scTCR 2C y se une al mismo aloepítipo restringido en H2-Ld. Shusta y col. (2000) Nature Biotechnology 18: 754-759 y en el documento de EE.UU. 6.423.538 comunican el uso de constructos murinos de TCR 2C de cadena sencilla en experimentos de presentación en levaduras, que produjeron TCR mutados con una estabilidad y térmica y solubilidad potenciadas. Este informe también demostró la capacidad de estos TCR 2C presentados para unirse de forma selectiva a células que expresan su pMHC conocido. Khandekar y col. (1997) J. Biol. Chem. 272 (51): 32190-7 comunican un diseño similar para el TCR D10 murino, aunque este scTCR estaba fusionado con MBP y se expresó en el citoplasma bacteriano (véase también Hare y col. (1999) Nat. Struct. Biol. 6 (6): 574-81). Hilyard y col. (1994) PNAS. 91 (19): 9057-61 comunican un scTCR humano específico para la proteína de matriz del influenza HLA-A2 usando un diseño $V\alpha$ -espaciador- $V\beta$ y de expresión en el periplasma bacteriano.

Chung y col. (1994) PNAS. 91 (26) 12654-8 comunican la producción de un scTCR humano usando un diseño $V\alpha$ -espaciador- $V\beta$ - $C\beta$ y expresión sobre la superficie de una línea celular de mamíferos. Este informe no incluye ninguna referencia a la unión específica péptido-HLA del scTCR. Plaksin y col (1997) J. Immunol. 158 (5): 2218-27 comunican un diseño $V\alpha$ -espaciador- $V\beta$ - $C\beta$ similar para producir un scTCR murino específico para un epítipo gp120-H-2Dd del VIH. Este scTCR se expresa en forma de cuerpos de inclusión bacterianos y se repliega *in vitro*.

En una serie de artículos se describe la producción de heterodímeros de TCR que incluyen el puente disulfuro nativo, que conecta las respectivas subunidades (Garboczi, y col., (1996), Nature 384(6605): 134-41; Garboczi, y col., (1996), J Immunol 157(12): 5403-10; Chang y col., (1994), PNAS USA 91: 11408-11412; Davodeau y col., (1993), J. Biol. Chem. 268(21): 15455-15460; Golden y col., (1997), J. Imm. Meth. 206: 163-169; patente de EE.UU. nº 6080840). No obstante, aunque dichos TCR se pueden reconocer mediante anticuerpos específicos de TCR, no se demostró que ninguno reconociera su ligando nativo aparte de a concentraciones relativamente altas y/o no eran estables.

En el documento WO 99/60120 se describe un TCR soluble que está correctamente plegado de modo que es capaz de reconocer a su ligando nativo, es estable durante un periodo de tiempo y puede producirse en cantidades razonables. Este TCR comprende un dominio extracelular de cadena α o γ del TCR dimerizado con un dominio extracelular de cadena β o δ del TCR, respectivamente, por medio de un par de péptidos de dimerización en el extremo C, como cremalleras de leucina. Esta estrategia de producir TCR suele ser aplicable a todos los TCR.

Reiter y col, Immunity, 1995, 2:281-287, detalla la construcción de una molécula soluble que comprende dominios variables de α y β del TCR estabilizados con puentes disulfuro, uno de los cuales está unido a una forma truncada de la exotoxina de Pseudomonas (PE38). Una de las razones indicadas para producir esta molécula era para superar la inestabilidad inherente de los TCR de cadena sencilla. La posición del nuevo puente disulfuro en los dominios variables del TCR se identificó mediante homología con los dominios variables de los anticuerpos, en los que estos se han introducido previamente (por ejemplo, véase Brinkmann, y col. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7538-7542, y Reiter, y col. (1994) Biochemistry 33: 5451-5459). No obstante, dado que esta homología no existe entre los dominios variables del anticuerpo y del TCR, dicha técnica no se podía emplear para identificar los sitios adecuados para los nuevos puentes disulfuro entre cadenas entre los dominios constantes del TCR.

Como se ha mencionado en lo que antecede, Shusta y col. (2000) Nature Biotechnology 18: 754-759 comunican el uso de constructos de TCR 2C de cadena sencilla en experimentos de presentación en levaduras. El principio de presentación de scTCR sobre partículas de fago se ha tratado previamente. Por ejemplo, el documento WO 99/19129 detalla la producción de scTCR y resume un posible procedimiento para la producción de partículas de fago que presentan scTCR del formato $V\alpha$ -Espaciador- $V\beta$ C β . No obstante, esta aplicación no contiene ejemplos que demuestren la producción de dichas partículas de fago que presenten TCR. Sin embargo, la aplicación sí hace referencia a una solicitud pendiente de tramitación.

“En dicha solicitud de EE.UU. pendiente de tramitación nº 08/813-781 se ha descrito la construcción de vectores de ADN que incluyan un segmento de ADN que codifique una molécula de scTCR fusionada con una proteína de la cubierta del bacteriófago (gen II o gen VIII)”.

Además, esta solicitud depende de la capacidad de los anticuerpos anti-TCR o de los complejos superantígeno MHC para reconocer los scTCR solubles no presentados en el fago para verificar su conformación correcta. Por tanto, no se ha demostrado de un modo concluyente la especificidad verdadera de la unión péptido-MHC de los scTCR en cualquier formato. Por último, en otro estudio (Onda y col., (1995) Molecular Immunology 32 (17-18) 1387-1397) se desvela la presentación en fagos de dos cadenas α de TCR murino en ausencia de sus respectivas cadenas β . Este estudio demostró que las partículas de fago que presentan una de las cadenas α del TCR (Derivada del hibridoma murino A.1.1) se unían preferentemente a los mismos péptidos inmovilizados en pocillos de microtitulación a los que el TCR completo respondería normalmente cuando fueran presentados por MHC de clase I-A^d murino.

Uso de la detección selectiva

Una serie de importantes interacciones celulares y respuestas celulares, incluida la sinapsis inmunitaria mediada por el TCR, son controladas por los contactos entre los receptores de la superficie celular y los ligandos presentados sobre las superficies de otras células. Estos tipos de contactos moleculares específicos son de crucial importancia para la correcta regulación bioquímica en el cuerpo humano y, por tanto, se están estudiando intensamente. En muchos casos, el objetivo de dichos estudios es concebir un medio de modular las respuestas celulares con el fin de prevenir o combatir la enfermedad.

Por tanto, los procedimientos con los que identificar compuestos que se unan con algún grado de especificidad a moléculas receptoras o ligandos humanos son importantes porque conducen al descubrimiento y desarrollo de nuevas terapéuticas para las enfermedades. En particular, los compuestos que interfieren con ciertas interacciones receptor-ligando poseen un potencial inmediato como agentes o portadores terapéuticos.

Los avances en química combinatoria que permiten la producción relativamente sencilla y rentable de bibliotecas de compuestos muy grandes han aumentado enormemente el ámbito de los análisis de compuestos. No obstante, las limitaciones de los programas de detección selectiva residen muy a menudo en la naturaleza de los ensayos que se pueden emplear, la producción de moléculas receptoras y ligandos adecuadas y lo bien que estos ensayos se pueden adaptar a los procedimientos de detección selectiva de alto rendimiento.

Procedimientos de presentación

A menudo es deseable presentar un péptido o polipéptido dado sobre la superficie de una partícula proteínica. Dichas partículas pueden servir como ayudas de la purificación para el péptido o polipéptido (dado que las partículas portadoras del péptido o polipéptido pueden separarse de contaminantes no deseados mediante sedimentación u otros procedimientos). También pueden servir como vacunas particuladas, de modo que la respuesta inmunitaria al péptido o polipéptido presentado en la superficie está estimulada por la presentación particulada. La proteína p24 del retrotransposón de levaduras y la proteína de la cubierta de superficie de la hepatitis B son ejemplos de proteínas que se autoensamblan en partículas. La fusión del péptido o polipéptido de interés con estas proteínas formadoras de partículas es un modo reconocido de presentar el péptido o polipéptido sobre la superficie de las partículas resultantes.

No obstante, los procedimientos de presentación en partículas se han usado principalmente para identificar proteínas con propiedades deseables tales como rendimientos de expresión potenciada, unión y/o características de estabilidad. Estos procedimientos implican crear un grupo diverso o “biblioteca” de proteínas o polipéptidos expresados sobre la superficie de partículas proteínicas. Estas partículas tienen dos características clave, en primer lugar cada partícula presenta una única proteína variante o polipéptido y, en segundo lugar, el material genético que codifica la proteína o polipéptido expresado está asociado con el de la partícula. A continuación, esta biblioteca se somete a uno o más ciclos de selección. Por ejemplo, esto puede consistir en poner en contacto un ligando con una biblioteca de presentación en partículas de receptores mutados e identificar qué receptores mutados se unen al ligando con la mayor afinidad. Una vez que el proceso de selección se ha completado, se pueden aislar el receptor o receptores con las propiedades deseadas y el material genético se puede amplificar con el fin de poder secuenciar los receptores.

Estos procedimientos de presentación entran dentro de dos amplias categorías, presentación *in-vitro* e *in-vivo*.

Todos los procedimientos de presentación *in vivo* residen en una etapa en la que la biblioteca, normalmente codificada en o con el ácido nucleico de una partícula replicable tal como un plásmido o un fago, el replicón se transforma en las células para permitir la expresión de las proteínas o los polipéptidos. (Plückthun (2001) Adv Protein Chem 55

ES 2 327 229 T3

367-403). Existen numerosos sistemas de replicación/huésped que se ha probado que son adecuados para la presentación *in vivo* de proteínas o polipéptidos. Éstos incluyen los siguientes

5 Fago/células bacterianas

Plásmido/células CHO

Vectores basados en las células de levaduras/plásmido de 2 μ m de levaduras

10 Baculovirus/células de insecto

Plásmido/células bacterianas

15 Los procedimientos de presentación *in vivo* incluyen procedimientos de presentación en la superficie de la célula en los que un plásmido se introduce en la célula huésped que codifica una proteína de fusión consistente en la proteína o polipéptido de interés fusionado con una proteína o polipéptido de la superficie celular. La expresión de esta proteína de fusión conduce a la presentación de la proteína o polipéptido sobre la superficie de la célula. Las células que presentan estas proteínas o polipéptidos de interés pueden someterse después a un proceso de selección tal como FACS y se pueden aislar y secuenciar los plásmidos obtenidos de la célula o células seleccionadas. Se han concebido sistemas de presentación sobre la superficie celular para células de mamífero (Higuschi (1997) J Immunol. Methods 202 193-204), células de levadura (Shusta (1999) J Mol Biol 292 949-956) y células bacterianas (Sameulson (2002) J. Biotechnol 96 (2) 129-154).

25 Se han publicado numerosas revisiones de las diversas técnicas de presentación *in vivo*. Por ejemplo, (Hudson (2002) Expert Opin Biol Ther (2001) 1 (5) 845-55) y (Schmitz (2000) 21 (Supp A) S106-S112).

30 Los procedimientos de presentación *in vitro* se basan en el uso de ribosomas para traducir las bibliotecas de ARNm en una matriz diversa de variantes proteicas o polipeptídicas. La unión entre las proteínas o los polipéptidos formados y el ARNm que codifica estas moléculas se mantiene mediante uno de dos procedimientos. La presentación convencional en ribosoma utiliza secuencias de ARNm que codifican una secuencia de unión corta (normalmente de 40-100 aminoácidos) y la proteína o polipéptido que se van a presentar. La secuencia de unión permite que la proteína o polipéptido presentado tenga suficiente espacio para volver a plegarse sin que el ribosoma lo impida estéricamente. La secuencia de ARNm carece de un codón de "terminación", esto asegura que la proteína o polipéptido expresados y el ARN permanecen unidos a la partícula ribosómica. El procedimiento de presentación relacionado con el ARNm se basa en la preparación de las secuencias de ARNm que codifican la proteína o polipéptido de interés y los espaciadores de ADN que portan un resto de puomicina. En cuanto que el ribosoma alcanza la unión ARNm/ADN, la traducción se detiene y la puomicina forma un enlace covalente con el ribosoma. Para una revisión reciente de estos dos procedimientos de presentación *in vitro* relacionados véase (Amstutz (2001) Curr Opin Biotechnol 12 400-405).

40 Particularmente preferida es la técnica de presentación en fago que se basa en la capacidad de las partículas de bacteriófago para expresar un péptido o polipéptido heterólogo fusionado con sus proteínas de superficie. (Smith (1985) Science 217 1315-1317). El procedimiento es bastante general y bien entendido en la técnica para la presentación de monómeros polipeptídicos. No obstante, en el caso de los polipéptidos que en su forma nativa se asocian en forma de dímeros, sólo la presentación en fago de anticuerpos parece haber sido investigada exhaustivamente.

45 Para la presentación de polipéptido monomérico hay dos procedimientos principales:

50 En primer lugar (Procedimiento A) mediante la inserción en un vector (fagemido) de ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo fusionado al ADN que codifica una proteína de recubrimiento del bacteriófago. A continuación se lleva a cabo la expresión de partículas de fago que presentan el péptido o polipéptido heterólogo mediante la transfección de células bacterianas con el fagemido y, después, la infección de las células transformadas con un "fago colaborador". El fago colaborador actúa como fuente de las proteínas del fago no codificadas por el fagemido requerido para producir una partícula de fago funcional.

55 En segundo lugar (Procedimiento B) mediante la inserción de ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo en un genoma de fago completo fusionado al ADN que codifica una proteína de recubrimiento del bacteriófago. A continuación se lleva a cabo la expresión de partículas de fago que presentan el péptido o polipéptido heterólogo mediante la infección de células bacterianas con el genoma del fago. Este procedimiento posee la ventaja del primer procedimiento de ser un procedimiento de "una sola etapa". No obstante, se reduce el tamaño de la secuencia de ADN heterólogo que se puede empaquetar con éxito en las partículas de fago resultantes. M13, T7 y Lambda son ejemplos de fagos adecuados para este procedimiento.

65 Una variación del (Procedimiento B) implica añadir una secuencia de ADN que codifica un dominio de unión nucleotídica al ADN en el genoma del fago, que codifica el péptido heterólogo a presentar, y añadir además el correspondiente sitio de unión nucleotídica al genoma del fago. Esto hace que el péptido heterólogo se una directamente al genoma del fago. Este complejo péptido/genoma se empaqueta después en una partícula de fago que presenta el péptido heterólogo. Este procedimiento se describe completamente en el documento WO 99/11785.

Las partículas de fago se pueden recuperar después y usar para estudiar las características de unión del péptido o polipéptido heterólogo. Una vez aislado, el ADN del fagemido o fago se puede recuperar de la partícula de fago que presenta el péptido o polipéptido, y este ADN se puede replicar mediante PCR. El producto de la PCR se puede usar para secuenciar el péptido o polipéptido heterólogo presentado por una partícula de fago dada.

La presentación en fago de anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de los mismos se ha convertido en un medio de rutina para estudiar las características de unión de estos polipéptidos. Se dispone de numerosos libros que revisan las técnicas de presentación en fagos y la biología del bacteriófago. (Véase, por ejemplo, Phage Display - A Laboratory Manual, Barbas y col., (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Un tercer procedimiento de presentación en fago (Procedimiento C) depende del hecho de que los polipéptidos heterólogos que tienen un residuo de cisteína en una localización deseada se pueden expresar en una forma soluble a través del genoma de un fagemido o un fago, y se pueden asociar con una proteína modificada de la superficie del fago que también posea un residuo de cisteína en una posición expuesta en la superficie, a través de la formación de un puente disulfuro entre las dos cisteínas. El documento WO 01/05950 detalla el uso de este procedimiento de unión alternativo para la expresión de péptidos derivados de anticuerpos de cadena sencilla.

Breve descripción de la invención

Los TCR nativos son heterodímeros que poseen dominios transmembrana de gran longitud que son esenciales para mantener su estabilidad como dímeros funcionales. Como se ha tratado en lo que antecede, los TCR son útiles para fines de investigación y terapéuticos en sus formas solubles, por lo que su presentación en la forma nativa insoluble tiene poca utilidad. Por otro lado, se ha probado que las formas estables solubles de los TCR son difíciles de diseñar y, dado que la mayoría de los procedimientos de presentación parecen haber sido descritos únicamente para péptidos monoméricos y polipéptidos, los procedimientos de presentación adecuados para los TCR diméricos solubles no se han investigado. Es más, dado que la funcionalidad de los TCR presentados depende de la asociación adecuada de los dominios variables del dímero de TCR, la presentación con éxito de un TCR dimérico funcional no es trivial.

El documento 99/18129 contiene la afirmación: "Los constructos de ADN que codifican las proteínas de fusión de scTCR se pueden usar para fabricar una biblioteca de presentación en bacteriófagos de acuerdo con procedimientos descritos en la solicitud de EE.UU. pendiente de tramitación n° de serie 08/813.781 concedida el 7 de marzo de 1997, cuya descripción se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia", pero en esta solicitud no se incluye ninguna descripción real de tal presentación. No obstante, los inventores de esta solicitud publicaron un artículo (Weidanz (1998) J Immunol Methods 221 59-76) que demuestra la presentación de dos scTCR murinos sobre las partículas de fago.

El documento WO 01/62908 desvela procedimientos para la presentación en el fago de scTCR y scTCR/proteínas de fusión con Ig. No obstante, no se ha evaluado la funcionalidad (unión específica a pMHC) de los constructos descritos.

Por último, se ha demostrado un procedimiento mediado por retrovirus para la presentación de diversas bibliotecas de TCR sobre la superficie de células T inmaduras para un TCR murino. La biblioteca de TCR mutados presentados en la superficie de las células T inmaduras se sometió a detección selectiva mediante citometría de flujo usando tetrámeros de pMHC, lo que condujo a la identificación de variantes de TCR que era específico para el pMHC conocido, o una variante del mismo. (Helmut y col., (2000) PNAS 97 (26) 14578-14583).

La presente invención se basa en parte en el hallazgo de que TCR de cadena sencilla y diméricos se pueden expresar como fusiones de superficie en las partículas de fago y permite la disposición de partículas de fago que presentan constructos de scTCR análogos de alfa/beta y análogos de gamma/delta y de dTCR. Dichos TCR presentados sobre partículas de fago son útiles para la purificación y detección selectiva, particularmente como una biblioteca diversa de TCR presentados en fagos para biopanning para identificar TCR con características deseables tales como afinidad elevada por el complejo MHC-péptido diana. En la última relación, los scTCR presentados sobre fagos pueden ser útiles para la identificación del TCR deseado, pero dicha información se puede aplicar mejor a la construcción de TCR diméricos análogos para su uso último en terapias. La invención también incluye TCR de alta afinidad identificables mediante estos procedimientos.

Descripción detallada de la invención

En un amplio aspecto, la presente invención proporciona una partícula de fago que presenta en su superficie un TCR polipeptídico de cadena sencilla (scTCR) o un par polipeptídico de TCR (dTCR), en el que dicho scTCR polipeptídico está constituido por

un primer segmento constituido por una secuencia del dominio variable de la cadena α o δ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR.

un segundo segmento constituido por una secuencia del dominio variable de la cadena β o γ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR.

ES 2 327 229 T3

una secuencia espaciadora que liga el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento, o viceversa, y

5 un puente disulfuro entre los segmentos primero y segundo, en el que dicho puente disulfuro es uno que no tiene equivalente en los receptores de células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nativos.

en el que dicho par polipeptídico de dTCR está constituido por

10 un primer polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena α o δ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR, y

un segundo polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena β o γ del TCR está fusionada con el extremo N de una secuencia correspondiente a un dominio constante de la cadena β del TCR.

15 Los polipéptidos primero y segundo, que están unidos por un puente disulfuro que no tiene equivalente en los receptores de células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nativos, en el que dicho puente disulfuro entre los segmentos primero y segundo del scTCR o entre los polipéptidos primero y segundo del dTCR entre cisternas están sustituidos por los siguientes pares de residuos en el exón 1 de TRAC*01 para la cadena α del TCR y de TRBC1*01 o TRBC2*01 para la cadena β del TCR.

20

Cadena α del TCR	Cadena β del TCR
Thr 48	Ser 57
Thr 45	Ser 77
Tyr 10	Ser 17
Thr 45	Asp 59
Ser 15	Glu 15

25

30

35 Las secuencias del dominio variable del par polipeptídico del dTCR o del polipéptido del scTCR están mutuamente orientadas sustancialmente como en los TCR nativos y el puente disulfuro entre los segmentos primero y segundo del scTCR o entre los polipéptidos primero y segundo del dTCR no tiene equivalente en los receptores nativos de las células T.

40 En el caso de los scTCR o dTCR $\alpha\beta$ presentados de acuerdo con la invención, el hecho de que las secuencias del dominio variable de los segmentos o polipéptidos α y β están mutuamente orientados sustancialmente como en los receptores de células T $\alpha\beta$ nativos implica que los TCR son funcionales, lo que se puede analizar confirmando que la molécula se une al ligando relevante del TCR (complejo pMHC, complejo CD1-antígeno, superantígeno o complejo superantígeno/pMHC), si se une se cumple el requisito. Las interacciones con complejos pMHC se pueden medir usando un instrumento Biacore 3000TM o Biacore 2000TM. El documento WO99/6120 proporciona descripciones detalladas de los procedimientos requeridos para analizar la unión del TCR a los complejos MHC-péptido. Estos procedimientos son igualmente aplicables al estudio de las interacciones TCR/CD1 y TCR/superantígeno. Con el fin de aplicar estos procedimientos al estudio de las interacciones TCR/CD1 se requieren las formas solubles de CD, cuya producción se describe en (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373). En el caso de los TCR $\gamma\delta$ de la presente invención, los ligandos conocidos para estas moléculas son desconocidos, por lo que se puede emplear medios secundarios de verificación de su conformación, tales como reconocimiento mediante anticuerpos.

50

El anticuerpo monoclonal MCA991T (disponible en Serotec), específico de la región variable de la cadena δ , es un ejemplo de un anticuerpo adecuado para esta tarea.

55 Los scTCR o dTCR de la presente invención se pueden presentar sobre partículas de fago, preferentemente partículas de fago filamentoso, mediante, por ejemplo, los dos medios siguientes:

60 (i) el extremo C de un miembro del par polipeptídico de dTCR, o el extremo C del polipéptido de scTCR, o el extremo C de un espaciador peptídico corto unido al extremo C de cualquiera de ellos, se puede unir directamente mediante un enlace peptídico a un residuo expuesto en la superficie de la partícula de fago. Por ejemplo, dicho residuo expuesto en la superficie está, preferentemente, en el extremo N del producto génico del gen III o el gen VIII del bacteriófago; y

65 (ii) El extremo C de un miembro del par polipeptídico de dTCR, o el extremo C del polipéptido de scTCR, o el extremo C de un espaciador peptídico corto unido al extremo C de cualquiera de ellos, está unido mediante un puente disulfuro a un residuo de cisteína expuesto en la superficie de la partícula de fago a través de un residuo de cisteína introducido. Por ejemplo, dicho residuo expuesto en la superficie está, de nuevo preferentemente, en el extremo N del producto génico del gen III o el gen VIII del bacteriófago.

Se prefiere el procedimiento (i) anterior. En el caso de un scTCR, el ácido nucleico que codifica el TCR puede estar fusionado con el ácido nucleico que codifica el fago. En el caso de un dTCR, el ácido nucleico que codifica una cadena del TCR puede estar fusionado con el ácido nucleico que codifica el fago, y la segunda cadena del par polipeptídico de TCR puede poder asociarse con la partícula resultante expresada que presenta la primera cadena. La asociación funcional adecuada de las dos cadenas está asistida por la presencia de las cisternas introducidas en el dominio constante de las dos cadenas, que son capaces de formar un puente disulfuro entre cadenas, como se trata completamente más adelante.

Par polipeptídico del dTCR y polipéptido de scTCR

Las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en los scTCR o dTCR corresponden, preferentemente, a las de un TCR humano, como también lo hacen las secuencias del dominio variable. No obstante, la correspondencia entre dichas secuencias no ha de ser de 1:1 a nivel de aminoácido. La fragmentación en N o C y/o la delección y/o sustitución de aminoácidos en relación con las correspondientes secuencias de TCR humano es aceptable. En particular, dado que las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en los segmentos primero y segundo no están directamente implicadas en los contactos con el ligando al que se unen los scTCR o dTCR, pueden ser más cortos, o pueden contener sustituciones o delecciones en relación con ellas, que las secuencias del dominio constante extracelular de los TCR nativos.

La secuencia extracelular del dominio constante presente en uno del par polipeptídico del dTCR, o en el primer segmento de un polipéptido de scTCR, puede incluir una secuencia correspondiente al dominio constante extracelular de Ig de la cadena α de un TCR, y/o la secuencia extracelular del dominio constante presente en el otro miembro del par o segundo segmento puede incluir una secuencia correspondiente al dominio Ig constante extracelular de la cadena β de un TCR.

En una forma de realización de la invención, un miembro del par polipeptídico del dTCR, o el primer segmento del polipéptido de scTCR, corresponde a sustancialmente todo el dominio variable de una cadena α de TCR fusionado con el extremo N de sustancialmente todo el dominio extracelular del dominio constante de una cadena α del TCR; y/o el otro miembro del par o del segundo segmento corresponde a sustancialmente todo el dominio variable de una cadena β del TCR fusionada con el extremo N de sustancialmente todo el dominio extracelular del dominio constante de una cadena β del TCR. En otra forma de realización, las secuencias extracelulares del dominio constante presente en el par polipeptídico del dTCR, o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR, corresponden a los dominios constantes de las cadenas α y β de un TCR nativo truncado por su extremo C de modo que los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro nativo entre cadenas del TCR quedan excluidos. Como alternativa, dichos residuos de cisteína pueden estar sustituidos por otro residuo de aminoácido tal como serina o alanina, de modo que se deleciona el puente disulfuro nativo. Además, la cadena β del TCR nativo contiene un residuo de cisteína no pareado y ese residuo puede eliminarse, o sustituirse por un residuo distinto a cisteína, en la secuencia β del scTCR de la invención.

En una forma de realización concreta de la invención, las secuencias del dominio variable de la cadena α y β del TCR presentes en el par polipeptídico del dTCR, o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR, pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares del dominio constante de la cadena α y β del TCR presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR, pueden corresponder a las de un segundo TCR, siendo los TCR primero y segundo de la misma especie. Por tanto, las secuencias del dominio variable de la cadena α y β presentes en el par polipeptídico del dTCR, o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR, pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de la cadena α y β pueden corresponder a las de un segundo TCR humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares del dominio constante del sTCR A6 Tax se pueden usar como estructura sobre la que se pueden fusionar los dominios variables heterólogos de α y β .

En otra forma de realización de la invención, las secuencias del dominio variable de la cadena δ y γ del TCR presentes en el par polipeptídico del dTCR, o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR respectivamente, pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares del dominio constante de la cadena α y β del TCR presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR respectivamente, pueden corresponder a las de un segundo TCR, siendo los TCR primero y segundo de la misma especie. Por tanto, las secuencias del dominio variable de la cadena δ y γ presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de cadena α y β pueden corresponder a las de un segundo TCR humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares del dominio constante del sTCR A6 Tax se pueden usar como estructura sobre la que se pueden fusionar los dominios variables heterólogos de γ y δ .

En una forma de realización concreta de la invención, las secuencias del dominio variable de cadena α y β , o δ y γ presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de cadena α y β del TCR presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR pueden corresponder a las de un segundo TCR no humano. Por tanto, las secuencias del dominio variable de cadena α y β , o δ y γ presentes en el par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR pueden corresponder a las de un primer TCR humano y las secuencias extracelulares del dominio constante de cadena α y β pueden corresponder a las de un segundo TCR no humano. Por ejemplo, las

ES 2 327 229 T3

secuencias extracelulares del dominio constante del TCR murino se pueden usar como estructura sobre la que se pueden fusionar los dominios variables heterólogos de α y β de TCR humano.

Espaciador en el polipéptido scTCR

Para las partículas de fago que presentan scTCR de la presente invención, una secuencia espaciadora une los segmentos primero y segundo del TCR para formar una hebra polipeptídica sencilla. La secuencia espaciadora puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P, en la que P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos son glicina y serina.

Para el scTCR presentado por partículas de fago de la presente invención para unirse a un ligando, el complejo MHC-péptido en el caso del los TCR $\alpha\beta$, los segmentos primero y segundo se acoplan de modo que las secuencias del dominio variable están orientados para dicha unión. Por tanto, el espaciador debería tener suficiente longitud para extender la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa. Por otro lado, preferentemente se evitará una longitud excesiva del espaciador, en caso de que el extremo del espaciador en la secuencia del dominio variable del extremo N bloquee o reduzca la unión del scTCR al ligando diana.

Por ejemplo, en el caso en el que las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en los segmentos primero y segundo correspondan a los dominios constantes de las cadenas α y β de un TCR nativo truncado en su extremo C de modo que los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro nativo entre cadenas del CR. quedan excluidos, y la secuencia espaciadora une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento, la secuencia espaciadora puede constar de, por ejemplo, de 26 a 41 aminoácidos, preferentemente 29, 30, 31 ó 32 aminoácidos, o 33, 34, 35 ó 36 aminoácidos. Espaciadores concretos tienen la fórmula PGGG-(SGGGG)₅-P- y -PGGG-(SGGGG)₆-P-, en la que P es prolina, G es glicina y S es serina.

Puente disulfuro entre cadenas

Un rasgo principal característico de los dTCR y scTCR preferidos presentados por partículas de fago de la presente invención es el puente disulfuro específico introducid entre las secuencias extracelulares del dominio constante del par polipeptídico del dTCR o de los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR. Dicho enlace no posee homólogo en los TCR nativos, está incorporado específicamente entre cisternas en las secuencias extracelulares del dominio constante del par polipeptídico del dTCR o los segmentos primero y segundo del polipéptido del scTCR. En algunos casos puede ser deseable un puente disulfuro nativo y uno no nativo.

El puente disulfuro puede formarse mediante mutación de residuos distintos a cisteína sobre los segmentos primero y segundo en cisteína y haciendo que se forme el enlace entre los residuos mutados. Los residuos sustituidos por cisteína son aquéllos cuyos respectivos carbonos β están separados por aproximadamente 6 Å (0,6 RUN) o menos, y, preferentemente, en el intervalo de 3,5 Å (0,35 nm) a 5,9 Å (0,59 nm) en el TCR nativo. El puente disulfuro está entre los residuos en el dominio constante de la inmunoglobulina. Los puntos en los que se van a introducir las cisternas para formar el puente disulfuro son los residuos siguientes en el exón 1 del TRAC*01 para la cadena α del TCR y TRBC *01 o TRBC2*01 para la cadena β del TCR.

Cadena α del TCR	Cadena β del TCR	Separación de carbonos β nativos (nm)
Thr 48	Ser 57	0,473
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 1,7	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

Los motivos siguientes en las respectivas cadenas de TCR humano se pueden usar para identificar el residuo que se va a mutar (el residuo sombreado es el residuo para la mutación a una cisteína).

Cadena α Thr 48:

DSDVYITDK[II]VLDMRSMDFK (aminoácidos 39-58 del exón 1 del gen TRAC*) (SEC ID 1)

ES 2 327 229 T3

Cadena α Thr 45:

5 QSKDSDVYI**I**DKTVLDMRSM (aminoácidos 36-55 del exón 1 del gen TRAC*01) (SEC ID 2)

10 Cadena α Tyr 10:

15 DIQNPDPAV**V**QLRDSKSSDK (aminoácidos 1-20 del exón 1 del gen TRAC*01) (SEC ID 3)

20 Cadena α Ser 15:

25 DPAVYQLR**D**SKSSDKSVCLF (aminoácidos 6-25 del exón 1 del gen TRAC*01) (SEC ID 4)

30 Cadena β Ser 57:

35 NGKEVHSGV**S**TDPQPLKEQP (aminoácidos 48-67 del exón genes TRBC1*01 y TRBC2*01 5)

40 Cadena β Ser 77:

45 ALNDSRYAL**S**SRLRVSAATFW (aminoácidos 68-87 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01) (SEC ID 6)

50 Cadena β Ser 17:

55 PPEVAVFEP**S**EAEISHTQKA (aminoácidos 8-27 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01) (SEC ID 7)

60 Cadena β Asp 59:

65 KEVHSGV**S**TDPQPLKEQPAL (aminoácidos 50-69 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC0*01) (SEC ID 8)

Cadena β Glu 15:

5 **VFPPEVAVFEPSEAEISHTQ** (aminoácidos 6-25 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01) (SEC ID 9)

10 En otras especies, las cadenas del TCR pueden no tener una región que tenga una identidad del 100% con los motivos anteriores. No obstante, el experto en la técnica podrá usar los motivos anteriores para identificar la parte equivalente de la cadena α o β del TCR y, por tanto, el residuo que se va a mutar a cisteína. A este respecto se pueden usar técnicas de alineación. Por ejemplo, se puede usar ClustalW, disponible en el sitio web del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) para comparar los motivos anteriores con una secuencia concreta de la cadena del TCR con el fin de localizar la parte relevante de la secuencia del TCR para detectar mutaciones.

15 La presente invención incluye dentro de su ámbito scTCR análogos de $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ presentados sobre la partícula de fago, así como los de otros mamíferos, incluidos, entre otros, ratón, rata, cerdo, cabra y oveja. Como se ha mencionado en lo que antecede, el experto en la técnica será capaz de determinar sitios equivalentes a los sitios humanos descritos en lo que antecede en los que se pueden introducir residuos de cisteína para formar un puente disulfuro entre cadenas. Por ejemplo, a continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de los dominios solubles $C\alpha$ y $C\beta$ de ratón, junto con motivos que muestran los residuos murinos equivalentes a los residuos humanos mencionados en lo que antecede que se pueden mutar a cisteínas para formar un puente disulfuro entre cadenas del TCR (en las que los residuos relevantes están sombreados).

25 Dominio soluble $C\alpha$ de ratón:

30 **PYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMK
AMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP (SEQ ID 10)**

35 Dominio soluble $C\beta$ de ratón:

40 **EDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGREV
HSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDK
WPEGSPKPVTQNISAEAWGRAD (SEQ ID 11)**

45 Equivalente murino de la Thr 48 de la cadena α humana:

ESGTFITDKTVLDMKAMDSK (SEC ID 12)

50 Equivalente murino de la Thr 45 de la cadena α humana:

KTMESGTFITDKTVLDMKAM (SEC ID 13)

55 Equivalente murino de la Tyr 10 de la cadena α humana:

ESGTFITDKTVLDMKAMDSK (SEC ID 14)

60 Equivalente murino de la Ser 15 de la cadena α humana:

AVYQLKDPRSQDSTLCLFTD (SEC ID 15)

65 Equivalente murino de la Ser 57 de la cadena β humana:

NGREVVHSGVSTDPQA YKESN (SEC ID 16)

ES 2 327 229 T3

Equivalente murino de la Ser 77 de la cadena β humana:

KESNYSYCLSSRLRVSATFW (SEC ID 17)

5

Equivalente murino de la Ser 17 de la cadena β humana:

PPKV SLFEPKAEIANKQKA (SEC ID 18)

10

Equivalente murino del Asp 59 de la cadena β humana:

REVHSGVSTDPQAYKESNYS (SEC ID 19)

15

Equivalente murino del Glu 15 de la cadena β humana:

VTPPKVSLFEPKAEIANKQ (SEC ID 20)

20

Como se ha tratado en lo que antecede, los dominios constantes extracelulares de sTCR A6 Tax pueden usarse como estructura sobre la que se pueden fusionar los dominios variables heterólogos. Se prefiere que las secuencias del dominio variable heterólogo estén unidas a las secuencias del dominio constante en algún punto entre el puente disulfuro y el extremo N de las secuencias del dominio constante. En el caso de las secuencias del dominio constante α y β del TCR A6 Tax, el puente disulfuro se puede formar entre los residuos de cisteína introducidos en los residuos de aminoácidos 158 y 172, respectivamente. Por tanto, se prefiere que los puntos de unión en la secuencia del dominio variable de la cadena α y β heterólogo estén entre los residuos 159 o 173 y el extremo N de las secuencias del dominio constante α o β , respectivamente.

30

Presentación del TCR

El procedimiento de presentación del TCR *in vivo* para biopanning para identificar TCR que poseen propiedades deseables tales como afinidad alta por un complejo péptido-MHC diana es la presentación en fago.

35

En primer lugar, se construye una biblioteca de ADN que codifica una matriz diversa de scTCR o dTCR mutados. Esta biblioteca se construye usando ADN que codifica un TCR nativo como molde para la amplificación. Existen numerosos procedimientos adecuados, conocidos por los expertos en la técnica, para la introducción de las mutaciones deseadas en el ADN del TCR y, por tanto, la proteína del TCR expresada finalmente. Por ejemplo, la PCR dirigida por error (EP-TCR), técnicas lanzadera de ADN y el uso de cepas bacterianas mutadas tales como XL-1-Red son medios convenientes de introducción de mutaciones en las secuencias del TCR. Es particularmente preferido que estas mutaciones se introduzcan en el dominio definido de los TCR. Por ejemplo, es probable que las mutaciones en el dominio variable, particularmente las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y/o regiones estructurales sean los sitios más adecuados para la introducción de mutaciones que conduzcan a la producción de una biblioteca diversa de TCR para la producción de TCR con propiedades potenciadas de unión al ligando. La EP-PCR es un ejemplo de procedimiento por el cual tales mutaciones "específicas de región" se pueden introducir en los TCR. Se usan cebadores de EP-PCR que sean complementarios a las secuencias de ADN que limitan la región que se va a mutar para amplificar múltiples copias de esta región del ADN del TCR que contiene un nivel controlable de mutaciones aleatorias. Estas secuencias de ADN que codifican regiones mutadas se insertan en las secuencias de ADN, que codifican las secciones no mutageneizadas del TCR, mediante PCR de ligamiento o superposición. El ADN que codifica el TCR con región mutada puede unirse después al ADN que codifica un polipéptido heterólogo con el fin de producir una proteína de fusión adecuada para la presentación. En el caso de la presentación en fago, el vector de expresión utilizado es un fagemido o un vector con genoma de fago en el que se pueda ligar el ADN del TCR al ADN que codifica una proteína de superficie, preferentemente la proteína de superficie gIII o gVIII. En el caso de un scTCR, tal unión se realiza como para la presentación en fago de cualquier péptido monomérico o polipéptido. En el caso de los dTCR, sólo una de las cadenas del TCR se liga del modo indicado en lo que antecede. La otra cadena está codificada en ácido nucleico para la co-expresión con ácido nucleico del fagemido o del fago colaborador, de modo que la segunda cadena expresada encuentra y se asocia con el fago expresado con la primera cadena presentada en la superficie. En ambos casos, como se ha tratado con más detalle en lo que antecede, las cisteínas adecuadamente colocadas en los dominios constantes son útiles para que los dominios variables del TCR adopten sus posiciones funcionales, a través de la formación de un puente disulfuro mediante dichas cisteínas.

Para expresión, un vector que comprende (a) ácido nucleico que codifica una cadena de un par polipeptídico del dTCR y (b) la otra cadena de un par polipeptídico de dTCR fusionado con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula o una proteína de superficie celular, el par dTCR, o una composición que comprende un primer vector que comprende ácido nucleico (a) y un segundo vector que comprende ácido nucleico (b), se ponen en contacto con células huésped capaces de causar la expresión del material genético codificado en condiciones adecuadas para permitir la transformación de dichas células. Tales vectores de expresión, sistemas de

65

ES 2 327 229 T3

expresión que comprenden vectores de fagemido o de genoma de fago que codifican dTCR y scTCR, y células huésped que los aojan forman aspectos adicionales de la presente invención. En una forma de realización preferida de la invención, los vectores de fagemido o de genoma de fago derivan de un fago filamentoso.

5 A continuación, las células transformadas se incuban para permitir la expresión de las partículas de fago que presentan el TCR. Estas partículas pueden usarse después para detección selectiva o en ensayos para identificar variantes de TCR con características específicas potenciadas. A continuación se pueden aislar todas las partículas que posean las características potenciadas en investigación. El ADN que codifica estos TCR se puede amplificar después mediante PCR y se puede determinar la secuencia.

10

Se sabe que niveles de expresión elevados de un polipéptido exógeno pueden ser tóxicos para la célula huésped.

En tales casos debe encontrarse una cepa huésped que sea más tolerante al polipéptido exógeno o los niveles de expresión en la célula huésped deben limitarse a un nivel que se tolere. Por ejemplo, (Beekwilder y col., (1999) Gene
15 228 (1-2) 23-31) comunican que sólo las formas mutadas de un inhibidor de la proteasa de patata (PI2) que contenían deleciones o codones de terminación ámbar se podrían seleccionar con éxito en una biblioteca de presentación de fagos. En este caso, una observación en el curso del trabajo comunicado en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva sugiere que puede ser deseable limitar los niveles de expresión de TCR presentados sobre partículas de la invención, al menos en algunas cepas de *E. coli*. Por tanto, se mostró que el TCR A6 seleccionado en el Ejemplo
20 2 después de repetidos ciclos de cultivo derivaba de células en las que el fagemido había mutado con respecto al introducido al principio. La mutación había creado un codón de terminación "ópalo" en la cadena β del TCR. Este codón se "lee" con frecuencia baja en los ribosomas de la cepa de *E. coli* utilizada y Tiene como resultado la inserción de un residuo de triptófano en este sitio y un nivel global muy reducido de la expresión de la cadena β de longitud completa.

25

Existen varias estrategias para limitar los niveles de expresión de un polipéptido exógeno en un sistema de expresión dado en un huésped, que puede ser adecuado para limitar los niveles de expresión de un scTCR, o una o ambas cadenas del TCR de un dTCR. Por ejemplo:

30 Uso de una secuencia promotor débil- El nivel de expresión obtenido para un producto génico dado, tal como la cadena α o β del TCR, se puede ajustar usando secuencias promotoras de varias fuerzas. El promotor PRM del fago lambda es un ejemplo de un promotor débil.

35 Sitios de unión al ribosoma mutados (RBS)- La mutación de un ácido nucleico sencillo en los RBS asociada con un producto génico, tal como la cadena α o β del TCR, puede tener como resultado una reducción del nivel de expresión. Por ejemplo, la mutación de una secuencia AGGA salvaje a AGGG.

40 "Codones de iniciación" mutados- La mutación de un ácido nucleico sencillo en el codón de iniciación asociada con un producto génico, tal como la cadena α o β del TCR, también puede tener como resultado una reducción del nivel de expresión. Por ejemplo, la mutación de un codón de iniciación AUG salvaje a GUG.

45 Mutaciones supresoras de sentido erróneo- Éstas se insertan dentro de las regiones codificadoras de la cadena β del TCR. Entre los ejemplos se incluyen el codón de terminación "ópalo" (UGA), este codón de terminación "con fugas" tiene como resultado la frecuencia baja de inserción de un aminoácido triptófano y la lectura del resto de la secuencia de codificación.

50 Modificación mediada por metabolitos de la fuerza del promotor- El nivel de expresión de un producto génico, tal como la cadena α o β del TCR, bajo el control de ciertos promotores, se puede regular por disminución mediante la adición de un metabolito relevante para las células que contienen el promotor. Por ejemplo, se pueden usar las adiciones de glucosa para regular por disminución la expresión de un producto génico bajo el control de un promotor Lac.

55 Uso del codón- Las células bacterianas y, por ejemplo, las células de mamífero tienen diferentes "preferencias" con respecto a los codones que usan para codificar ciertos aminoácidos. Por ejemplo, las células bacterianas usan con más frecuencia el codón CGU para codificar arginina, mientras que las células eucarióticas usan con más frecuencia AGA. Es posible reducir el nivel de expresión de un producto génico, tal como la cadena α o β del TCR mediante la utilización de secuencias de ADN que contienen una serie de codones menos preferidos mediante el sistema de expresión que se esté utilizando.

60 Los detalles relacionados con los medios anteriores de regulación por disminución de la expresión del producto génico se pueden encontrar en (Glass (1982) Gene Function - *E. coli* and its heritable elements, Croom Helm) y (Rezinoff (1980) The Operon 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory).

65 También se sabe que suministrando cultivos bacterianos con una concentración relativamente alta de un azúcar tal como sacarosa se puede incrementar los niveles de expresión periplásmica de proteínas solubles. (Véase, por ejemplo, (Sawyer y col., (1994) Protein Engineering 7 (11) 1401-1406)). Tras la expresión, el correcto apareamiento de las secuencias del dominio variable del polipéptido del scTCR está asistido, preferentemente, por la introducción de un

puente disulfuro en el dominio constante extracelular del scTCR. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que el nuevo puente disulfuro proporciona una estabilidad adicional al scTCR durante el proceso de plegamiento y, de este modo, se facilita el correcto apareamiento de los segmentos primero y segundo.

5 También como se ha mencionado en lo que antecede, para la presentación del dTCR en fago, uno de los pares polipeptídicos del dTCR se expresa como si, en última instancia, se fuera a presentar como un polipéptido monomérico sobre el fago, y el otro del par polipeptídico del dTCR se co-expresa en la misma célula huésped. Dado que la partícula de fago se autoensambla, los dos polipéptidos se autoasocian para su presentación como dímero sobre el fago. De nuevo, en la forma de realización preferida de este aspecto de la invención, el correcto plegamiento durante la asociación del par polipeptídico está asistido por un puente disulfuro entre las secuencias constantes, como se ha tratado en lo que antecede. Otros detalles de un procedimiento para la presentación en fago de un dTCR que tiene un puente disulfuro entre cadenas aparecen en los Ejemplos en la presente memoria descriptiva.

15 Como alternativa, el fago que presenta la primera cadena del dTCR puede expresarse primero y la segunda cadena polipeptídica puede ponerse en contacto con el fago expresado en una etapa posterior, para su asociación como dTCR funcional en la superficie del fago.

20 El procedimiento de presentación del TCR *in vitro* preferido para biopanning para identificar TCR que poseen propiedades deseables tales como afinidad alta por un complejo péptido-MHC diana es la presentación en ribosoma. En primer lugar, se construye una biblioteca de ADN que codifica una matriz diversa de polipéptidos de scTCR o dTCR mutados usando las técnicas que se han tratado en lo que antecede.

25 A continuación, la biblioteca de ADN se pone en contacto con ARN polimerasa con el fin de producir una biblioteca de ARNm complementario. Opcionalmente, para las técnicas de presentación de ARNm, las secuencias de ARNm pueden unirse a una secuencia de ADN que comprende un sitio de unión a puromicina. Estos constructos genéticos se ponen en contacto después con ribosomas *in vitro* bajo condiciones que permitan la traducción del polipéptido de scTCR o el primer polipéptido del par de dTCR. En el caso del dTCR, el segundo de los pares polipeptídicos se expresa por separado y se pone en contacto con el primer polipéptido presentado por ribosomas, para la asociación entre los dos, asistida preferentemente por la formación del puente disulfuro entre los dominios constantes. Como alternativa, los ARNm que codifican ambas cadenas del TCR pueden ponerse en contacto con los ribosomas *in vitro* en condiciones que permitan la traducción de las cadenas de TCR de modo que se forme un ribosoma que presente un dTCR. Estos ribosomas que presentan scTCR o dTCR pueden usarse después para detección selectiva o en ensayos para identificar variantes de TCR con características específicas potenciadas. A continuación se pueden aislar todas las partículas que posean las características potenciadas en investigación. El ARNm que codifica estos TCR puede convertirse después en las secuencias de ADN complementarias usando la transcriptasa inversa. Este ADN se puede amplificar después mediante PCR y se puede determinar la secuencia.

40 *Aspectos adicionales*

Una partícula de fago que presenta un scTCR o dTCR (que preferentemente está constituido por secuencias constantes y variables correspondientes a secuencias humanas) de la presente invención se puede proporcionar en forma sustancialmente pura o en forma de preparación purificada o aislada. Por ejemplo, se puede proporcionar en una forma que esté sustancialmente libre de otras proteínas.

45 Una partícula de fago que presenta una pluralidad de scTCR o dTCR de la presente invención se puede proporcionar un complejo multivalente. Por tanto, la presente invención proporciona, en un aspecto, un completo del receptor de células T multivalente, que comprende una partícula de fago que presenta una pluralidad de scTCR o dTCR tal y como se describe en la presente memoria descriptiva.

50 Cada uno de la pluralidad de dichos scTCR o dTCR es, preferentemente, idéntico.

55 *Aislamiento de variantes de TCR con características potenciadas*

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la identificación de TCR con una característica específica, en el que dicho procedimiento comprende someter una biblioteca diversa de TCR presentados sobre partículas de fago a un proceso de selección que selecciona según dicha característica, y aislar partículas de fago que presentan un TCR que posee dicha característica, y, opcionalmente, a un procedimiento de amplificación para multiplicar las partículas aisladas y/o un proceso de detección selectiva que mide dicha característica, identificando las partículas de fago que presentan un TCR con la característica deseada y aislar estas partículas de fago y, opcionalmente, a un procedimiento de amplificación para multiplicar las partículas aisladas.

65 Las secuencias de ADN que codifican los TCR variantes se pueden obtener después y amplificar mediante PCR para permitir la determinación de las secuencias. Las características que se pueden potenciar incluyen, entre otras, la afinidad de unión por el ligando y la estabilidad del constructo.

Uso de la detección selectiva

Las partículas de fago que presentan TCR de la presente invención pueden utilizarse en procedimientos de detección selectiva diseñadas para identificar moduladores, incluidos inhibidores, de la sinapsis inmunitaria celular mediada por TCR.

Como los expertos en la técnica conocen, hay numerosos formatos de ensayo que proporcionan una base adecuada para la detección selectiva de interacciones proteína-proteína de este tipo.

Los sistemas de Ensayo de Proximidad Luminiscente Homogéneo con Amplificación, tales como el AlphaScreen™, dependen del uso de perlas “Donante” y “Aceptor” que están recubiertas con una capa de hidrogel a las que se pueden unir las proteínas receptor y ligandos. La interacción entre estas moléculas receptor y ligando acerca las perlas entre sí. Cuando estas perlas se someten a una luz láser, un fotosensibilizador en la perla “Donante” convierte el oxígeno ambiente en un estado de singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno del estado de singlete difunden de un extremo a otro para reaccionar con una sustancia quimioluminiscente en la perla “Aceptor” que activa aún más los fluoróforos contenidos dentro de la misma perla. Los fluoróforos posteriormente emiten luz a 520-620 nm, esto señala que se ha producido la interacción receptor-ligando. La presencia de un inhibidor de la interacción receptor-ligando hace que esta señal disminuya.

La resonancia de plasmón de superficie (RPS) es un ensayo óptico interfacial, en el que una pareja de unión (normalmente el receptor) se inmoviliza en un “chip” (la superficie del sensor) y se detecta la unión de la otra pareja de unión (normalmente el ligando), que es soluble y se hace que fluya sobre el chip. La unión del ligando tiene como resultado un incremento en la concentración de proteína cerca de la superficie del chip, lo que produce un cambio en el índice de refracción en dicha región. La superficie del sensor está comprimida de modo que el cambio en el índice de refracción se puede detectar mediante resonancia de plasmón de superficie, un fenómeno óptico a través del cual la luz a un cierto ángulo de incidencia sobre una película metálica fina produce un haz reflejado de intensidad reducida debido a la excitación resonante de ondas de densidad de carga superficial oscilatoria (plasmones de superficie). La resonancia es muy sensible a los cambios en el índice de refracción en el lado distal de la película metálica y es esta señal la que se usa para detectar la unión entre las proteínas inmovilizadas y solubles. Comercialmente se dispone de sistemas que permiten el uso conveniente de detección por RPS de las interacciones moleculares y análisis de datos. Ejemplos son las máquinas Iasys™ (Fisons) y las máquinas Biacore™.

Otros ensayos ópticos interfaciales incluyen fluorescencia reflectante interna total (TIRF), espejo de resonancia (RM) y sensor acoplador de rejilla óptica (GCS) y se tratan con más detalle en Woodbury and Venton (J. Chromatog. B. 725 113-137 (1999)). El ensayo de proximidad por centelleo (SPA) se ha usado para la detección selectiva en bibliotecas de compuestos de inhibidores de la interacción de baja afinidad entre CD28 y B7 (K_d probablemente en la región de 4 μ M (Van der Merwe y col. J. Exp. Med. 185:393-403 (1997), Jenh y col., Anal Biochem 165(2) 287-93 (1998)). El SPA es un ensayo radioactivo que usa la emisión de partículas beta por parte de ciertos isótopos radioactivos que transfiere energía a una sustancia centelleante inmovilizada sobre la superficie indicadora. El corto intervalo de las partículas beta en solución garantiza que el centelleo se produzca sólo cuando las partículas beta se emiten en estrecha proximidad con la sustancia centelleante. Cuando se aplica para la detección de interacciones proteína-proteína, una pareja de la interacción se marca con el radioisótopo, mientras que la otra se une a las perlas que contienen la sustancia de centelleo o recubren una superficie junto con la sustancia de centelleo. Si el ensayo se puede configurar de forma óptima, el radioisótopo se acercará lo suficiente a la sustancia de centelleo como para que se active la emisión de fotones únicamente cuando se produzca la unión entre las dos proteínas.

TCR de alta afinidad

La presente invención permite la identificación de TCR mutados específicos de un ligando de TCR dado con mayor afinidad por dicho ligando de TCR que el ECR de tipo salvaje. Cabe esperar que estos TCR de alta afinidad sean particularmente útiles para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “TCR de alta afinidad” se refiere a un scTCR o d TCR mutado que interacciona con un ligando específico del TCR y o tiene una K_d para dicho ligando del TCR inferior a la correspondiente a un TCR nativo medida mediante Resonancia de plasmón superficial o tiene una constante de velocidad (k_{off}) para dicho ligando del TCR inferior a la del correspondiente de un TCR nativo medida mediante resonancia de plasmón superficial.

Los scTCR o dTCR de alta afinidad permitidos por la presente invención están mutados, preferentemente, con respecto al TCR nativo en al menos una región determinante de la complementariedad y/o regiones estructurales.

En un aspecto, el ligando del TCR para el cual es específico un TCR de alta afinidad dado es un complejo péptido-MHC (pMHC).

En otro aspecto, el ligando del TCR para el cual es específico un TCR de alta afinidad dado es un tipo o tipos de MHC.

ES 2 327 229 T3

En otro aspecto más, el ligando del TCR para el cual es específico un TCR de alta afinidad dado es el complejo HLA-A2-péptido tax (LLFGYPVYV) (SEC ID 21).

5 En otro aspecto más, el ligando del TCR para el cual es específico un TCR de alta afinidad dado es el complejo HLA-A2-NY-péptido ESO (SLLMITQC) (SEC ID 22).

10 Un scTCR de alta afinidad o una o las dos cadenas del dTCR de alta afinidad pueden marcarse con un compuesto de imagen, por ejemplo un marcador que sea adecuado para propósitos diagnósticos. Tales TCR de alta afinidad marcados son útiles en un procedimiento para detectar un ligando de TCR seleccionado de complejos CD1-antígeno, superantígenos bacterianos y complejos MHC-péptido/superantígeno, en el que el procedimiento comprende poner en contacto el ligando del TCR con un TCR de alta afinidad (o un complejo de TCR de alta afinidad multimérico) que sea específico del ligando del TCR; y para detectar la unión al ligando del TCR. En los complejos de TCR de alta afinidad tetraméricos (formados, por ejemplo, usando heterodímeros biotinilados) se puede usar estreptavidina fluorescente (comercialmente disponible) para proporcionar un marcador detectable. Un tetramero marcado con fluorescencia es adecuado para usar en el análisis FACS para, por ejemplo, detectar células presentadoras de antígeno que portan el péptido para el que es específico el TCR de alta afinidad.

20 Otro modo por el que se pueden detectar los TCR de alta afinidad solubles permitidos por la presente invención es mediante el uso de anticuerpos específicos de TCR, en particular anticuerpos monoclonales. Hay muchos anticuerpos anti-TCR comercialmente disponibles, tales como α F1 y β F1, que reconocen los dominios constantes de las cadenas α y β , respectivamente.

25 Un TCR de alta afinidad (o un complejo multivalente del mismo) permitido por la presente invención puede asociarse, como alternativa o adicionalmente) con un agente terapéutico (p. ej., de forma covalente o mediante otro tipo de enlace) que puede ser, por ejemplo, un resto tóxico para usar para matar células, o un agente inmunoestimulante tales como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR multivalente de alta afinidad puede poseer una capacidad de unión potenciada por un ligando de TCR en comparación con un receptor de células T no multimérico o heterodimérico salvaje o de alta afinidad. Por tanto, los complejos de TCR multivalentes de alta afinidad son particularmente útiles para el seguimiento u orientación de células que presentan antígenos particulares *in vitro* o *in vivo*, y también son útiles como intermediarios para la producción de otros complejos multivalentes de TCR de alta afinidad que tienen tales usos. El TCR de alta afinidad o el complejo multivalente de TCR de alta afinidad puede, por tanto, proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para usar *in vivo*.

35 Se puede administrar un agente terapéutico a una célula diana poniendo en contacto posibles células diana con un TCR de alta afinidad o un complejo multivalente de TCR de alta afinidad en condiciones que permitan la unión del TCR de alta afinidad o del complejo multivalente de TCR de alta afinidad con la célula diana, en el que dicho TCR de alta afinidad o complejo multivalente de TCR de alta afinidad es específico del ligando del TCR y que tiene asociado el agente terapéutico.

40 En particular, el TCR soluble de alta afinidad o el complejo multivalente de TCR de alta afinidad se pueden usar para administrar agentes terapéuticos en la localización de células que presentan un antígeno concreto. Esto sería útil en muchas situaciones y, en particular, frente a tumores. Se podría liberar un agente terapéutico de modo que ejerciera su efecto localmente, pero no sólo sobre la célula a la que se une. Por tanto, una estrategia concreta prevé moléculas anti-tumorales unidas a receptores de células T de alta afinidad o a complejos multivalentes de TCR de alta afinidad específicos para antígenos tumorales.

45 Muchos agentes terapéuticos podrían emplearse para este uso, por ejemplo compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejercen en la localización deseada, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido a estreptavidina de modo que el compuesto se libere lentamente. Esto evitará que se produzcan efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y asegurará que la toxina tenga el efecto máximo después de la unión del TCR a las células presentadoras de antígeno relevantes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- 55
- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de matar células de mamífero que tienen un peso molecular inferior a 700 dalton. Tales compuestos podrían también contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen pro-fármacos, es decir, compuestos que se degradan o convierten en condiciones fisiológicas para liberar los agentes citotóxicos. Ejemplos de dichos agentes incluyen cisplatino, derivados de maytansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, sorfimer sodiofotofrina II, temozolmida, topotecán, trimetreato glucuronato, auristatin E vincristina y doxorubicina;
 - Citotoxinas peptídicas, es decir proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de matar células de mamífero. Entre los ejemplos se incluyen ricino, toxina diftérica, exotoxina A de la bacteria pseudomonas, ADNasa y ARNasa;
- 65

ES 2 327 229 T3

- Radionúclidos, es decir isótopos inestables de elementos que se degradan con la emisión simultánea de una o más partículas α o β , o rayos γ . Entre los ejemplos se incluyen yodo 131, renio 186, indio 111, ytrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astatina 213; se pueden usar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos con los TCR de alta afinidad, o multímeros de los mismos;

5

- Profármacos, tales como profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos.

10

- Inmunoestimulantes, es decir restos que estimulan la respuesta inmunitaria. Entre los ejemplos se incluyen citocinas tales como IL-2, quimiocinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanoma, etc., anticuerpos o fragmentos de los mismos, activadores del complemento, dominios de proteína xenogénea, dominios de proteína alogénea, dominios de proteína viral/bacteriana y péptidos virales/bacterianos.

15

Los TCR solubles de alta afinidad o complejos multivalentes de TCR de alta afinidad permitidos por la invención pueden unirse a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco únicamente en el sitio en el que es necesario (es decir, dirigido por el sTCR).

20

Potencialmente se pueden potenciar una multitud de tratamientos de enfermedad localizando el fármaco mediante la especificidad de los TCR solubles de alta afinidad. Por ejemplo, cabe esperar que los TCR de alta afinidad específico de HLA-A2-tax (LLFGYPVYV), (SEC ID 21) que se describen en la presente memoria descriptiva se pueden usar en procedimientos para el diagnóstico y tratamiento del HTLV-1 y que el TCR NY-ESO de alta afinidad específico de HLA-A2-NY-ESO (SLLMITQC) (SEC ID 22) descrito en la presente memoria descriptiva se puede usar en procedimientos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

25

Enfermedades virales para las que existen fármacos, por ejemplo VIH, VIS, EBV, CMV, se beneficiarían de la liberación o activación del fármaco en las proximidades de las células infectadas. Para el cáncer, la localización en las proximidades de tumores o metástasis potenciaría el efecto de toxinas o inmunoestimulantes. En enfermedades autoinmunitarias, los fármacos inmunosupresores podrían liberarse lentamente y tendrían un efecto más local en un periodo de tiempo más prolongado afectando de un modo mínimo a la capacidad inmunitaria global del sujeto. En la prevención del rechazo de injertos, el efecto de los fármacos inmunosupresores podría optimizarse del mismo modo. Para la administración de vacunas, el antígeno vacunal podría localizarse en las proximidades de las células presentadoras de antígeno, lo que potencia la eficacia del antígeno. El procedimiento también se puede aplicar con fines de imagen.

30

Enfermedades autoinmunitarias, los fármacos inmunosupresores podrían liberarse lentamente y tendrían un efecto más local en un periodo de tiempo más prolongado afectando de un modo mínimo a la capacidad inmunitaria global del sujeto. En la prevención del rechazo de injertos, el efecto de los fármacos inmunosupresores podría optimizarse del mismo modo. Para la administración de vacunas, el antígeno vacunal podría localizarse en las proximidades de las células presentadoras de antígeno, lo que potencia la eficacia del antígeno. El procedimiento también se puede aplicar con fines de imagen.

35

Los TCR solubles de alta afinidad permitidos por la presente invención se pueden usar para modular la activación de las células T uniéndose al ligando específico de TCR y, de este modo, inhibiendo la activación de las células T. Las enfermedades autoinmunitarias que implican inflamación mediada por células T y/o daño tisular serían susceptibles a este enfoque, por ejemplo la diabetes de tipo I. Para este uso se requiere conocer el epítipo peptídico específico presentado por el pMHC relevante.

40

Normalmente, los TCR de alta afinidad terapéuticos o para imagen permitidos por la invención se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (Dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente). Puede proporcionarse en forma de dosificación unitaria, generalmente se proporcionarán en un envase sellado y puede proporcionarse como parte de un kit. Normalmente (aunque no necesariamente), tal kit incluiría instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitaria.

45

La composición farmacéutica puede adaptarse para su administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo por vía parenteral, transdérmica o inhalación, preferentemente por vía parenteral (incluidas las vías subcutánea, intramuscular o, más preferentemente, intravenosa). Dichas composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo mezclando el ingrediente activo con el(los) portador(es) o excipiente(s) en condiciones estériles.

50

Las dosis de los sustratos de la presente invención pueden variar entre amplios límites, en función de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo que se va a tratar etc., y, en última instancia, será un médico el que determine las dosis adecuadas que se habrán de usar.

55

Las dosis de los sustratos de la presente invención pueden variar entre amplios límites, en función de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo que se va a tratar etc., y, en última instancia, será un médico el que determine las dosis adecuadas que se habrán de usar.

Ejemplos

60

La invención se describe más en los ejemplos siguientes, que no limitan el ámbito de la invención de ningún modo. A continuación se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

65

Las Figuras 1a y 1b muestran, respectivamente, las secuencias de ácido nucleico de las cadenas α y β de un TCR A6 soluble, mutadas de modo que se ha introducido un codón de cisteína. El sombreado indica los codones de cisteína introducidos.

ES 2 327 229 T3

La figura 2a muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena α del TCR A6, que incluye la mutación $T_{48} \rightarrow C$ (subrayada) usada para producir el nuevo puente disulfuro entre cadenas, y la figura 2b muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena β del TCR A6, que incluye la mutación $S_{57} \rightarrow C$ (subrayada) usada para producir el nuevo puente disulfuro entre cadenas.

La figura 3 es un esquema de la clonación de las cadenas α y β de TCR en vectores fagemido. El diagrama describe un vector de presentación en fago. RSB es el sitio de unión al ribosoma. S1 o S2 son péptidos señal para la secreción de proteínas en el periplasma de *E. coli*. El * indica el codón de terminación de la traducción. Cualquiera de las cadenas, cadena α o β del TCR se puede fusionar con la proteína de la cubierta del fago, aunque en este diagrama solo la cadena β del TCR está fusionada con la proteína de la cubierta del fago.

La figura 4 detalla la secuencia de ADN del fagemido pEX746:A6.

La figura 5 es la expresión de fusiones de partículas de fago de la proteína de la cubierta bacteriana y TCR A6 heterodimérico en *E. coli*. Las proteínas de fusión del TCR A6 heterodimérico::gIII se detectan usando transferencia de tipo western. Las partículas de fago se preparan a partir de *E. coli* XL-1-Blue y se concentran con PEG/NaCl. Las muestras se cargan en tampones de la muestra reductores o no reductores. La calle 1 es la muestra del clon 7 que contiene la secuencia correcta y la calle 2 es la muestra del clon 14 que contiene una delección en el gen que codifica la cadena α . La proteína de fusión TCR A6 heterodimérico::gIII se detectó a 125 kDa.

La figura 6 ilustra la detección mediante ELISA de la actividad de unión del complejo peptídico pMHC de un TCR A6 heterodimérico presentado sobre el fago. El clon 7 se une específicamente al complejo HLA A2-Tax. El clon 14 no se puede unir a ningún pMHC, ya que ningún TCR está unido a las partículas de fago.

La Figura 7a es una ilustración esquemática del constructo de presentación en ribosoma del ADN monocatenario de TCR A6-C-Kappa.

Las Figuras 7b y 7c detallan la hebra completa de ADN codificado y la secuencia de aminoácidos del constructo de presentación en ribosoma del ADN monocatenario de TCR A6-C-Kappa codificados en pUC19 respectivamente.

La figura 8 detalla la secuencia de ADN del pUC19-T7.

La Figura 9 detalla la secuencia de ADN del constructo de presentación en ribosoma del TCR monocatenario A6-C-Kappa que se clonó en pUC19-t7.

La figura 10 es una transferencia de tipo western que muestra la detección del TCR monocatenario A6-C-Kappa traducido *in vitro* usando lisados de reticulocitos de conejo Ambion.

La Figura 11 es una RT-PCR del ARNm del TCR monocatenario A6-C-Kappa en perlas rescatadas de las reacciones de presentación en ribosoma.

La figura 12a detalla la secuencia de ADN de la cadena β mutada del clon 9 de TCR A6; el ácido nucleico mutado se indica en negrita.

La figura 12b detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena β mutada del clon 9 de TCR A6, la posición correspondiente al codón de terminación ópalos introducido se indica con un *.

La figura 13 detalla la secuencia de ADN de la cadena β mutada del clon 49 de TCR A6; el ácido nucleico mutado se indica en negrita. Dado que esta es una mutación "silenciosa", con esta mutación no se introduce ningún cambio en la secuencia de aminoácidos resultante.

La figura 14a detalla la secuencia de ADN de la cadena β mutada del clon 134 de TCR A6; los ácidos nucleicos mutados se indican en negrita.

La figura 14b detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena β mutada del clon 134 de TCR A6 como se analiza mediante el ensayo BIAcore; los aminoácidos mutados se indican en negrita.

La figura 14c detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena β mutada del clon 134 de TCR A6 como se analiza mediante ELISA del fago; los aminoácidos mutados se indican en negrita.

La figura 15 son datos de BIAcore para la unión del clon 134 del TCR A6 a HLA-A2 Tax y HLA-A2 NY-ESO.

La figura 16 son los datos de BIAcore usados para determinar la T_{OFF} para la unión del clon 134 del TCR A6 a HLA-A2 Tax.

Las figuras 17a y 17b muestran la secuencia de ADN de las cadenas α y β mutadas del TCR NY-ESO respectivamente.

ES 2 327 229 T3

Las figuras 18a y 18b muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas α y β mutadas del TCR NY-ESO respectivamente.

5 Las figuras 19a y 19b detallan la secuencia de ADN y de aminoácidos de la cadena β del TCR NY ESO incorporada en el fagemido pEX746:NY-ESO respectivamente.

La figura 20 muestra la unión específica de las partículas de fago que presentan el TCR NY-ESO a HLA-A2-NY-ESO en un ensayo ELISA del fago.

10 La Figura 21 muestra la secuencia de ADN de la cadena DR1 α que incorpora codones que codifican el péptido de dimerización Fos unido al extremo 3' de la secuencia DRA0101.

El sombreado indica los codones Fos y los codones de marcaje de biotilación están indicados en texto en negrita.

15 La figura 22 muestra la secuencia de ADN del vector bi-cistrónico pAcAB3 usado para la expresión de complejos péptido-HLA de clase II en células de insecto Sf9. El sitio de restricción Bgl II (AGATCT) usado para insertar la cadena α de HLA y el sitio de restricción BamHI (GGATCC) usado para insertar la cadena β de HLA están indicados mediante sombreado.

20 La figura 23 muestra la secuencia de ADN de la cadena β de DR1 que incorpora los codones que codifican el péptido de dimerización Jun unido al extremo 3' de la secuencia de DRB0401 y los codones que codifican un péptido cargado con HLA unido al extremo 5' de la secuencia de DRB0401. El sombreado indica los codones Jun y los codones del péptido Flu Ha cargado con HLA están subrayados.

25 La figura 24 muestra una traza BIAcore de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad a células de flujo recubiertas del siguiente modo:

30 Célula de flujo 1 (CF-1)- Blanco
Célula de flujo 2 (CF-2)- HLA-A2 (LLGRNSFEV) (SEC ID 23)
35 Célula de flujo 3 (CF-3)- HLA-A2 (KLVALGINAV) (SEC ID 24)
Célula de flujo 4 (CF 4)- HLA-A2 (LLGDLFV) (SEC ID 25)

40 La figura 25 muestra una traza BIAcore de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad a células de flujo recubiertas del siguiente modo:

45 Célula de flujo 1 (CF-1)- Blanco
Célula de flujo 2 (CF 2)- HLA-B8 (FLRGRAYGL) (SEC ID 26)
Célula de flujo 3 (CF-3)- HLA-B27 (HRCQAIRKK) (SEC ID 27)
50 Célula de flujo 4 (CF 4)- HLA-Cw6 (YRSGIIAVV) (SEC ID 28)

55 La figura 26 muestra una traza BIAcore de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad a células de flujo recubiertas del siguiente modo:

Célula de flujo 1 (CF-1)- Blanco
60 Célula de flujo 2 (CF 2)- HLA-A24 (VYGFVRACL) (SEC ID 29)
Célula de flujo 3 (CF-3)- HLA-A2 (ILAKFLHWL) (SEC ID 30)
65 Célula de flujo 4 (CF 4)- HLA-A2 (LTLGEFLKL) (SEC ID 31)

ES 2 327 229 T3

La figura 27 muestra una traza BIAcore de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad a células de flujo recubiertas del siguiente modo:

5 Célula de flujo 1 (CF-1)- Blanco

Célula de flujo 2 (CF 2)- HLA-DR1 (PKYVKQNTLKLA) (SEC ID 32)

10 Célula de flujo 3 (CF-3)- HLA-A2 (GILGFVFTL) (SEC ID 33)

Célula de flujo 4 (CF 4)- HLA-A2 (SLYNTVATL) (SEC ID 34)

15 La figura 28 muestra una traza BIAcore de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad a células de flujo recubiertas del siguiente modo:

Célula de flujo 1 (CF-1)- Blanco

20 Célula de flujo 4 (CF 4)- HLA-A2 (LLFGYPVYV) (SEC ID 21)

Las figuras 29a y 29b muestran gráficos Biacore de la interacción entre el TCR NY-ESO soluble de alta afinidad y HLAA2 NY-ESO.

25 Las figuras 30a y 30b muestran gráficos Biacore de la interacción entre el TCR NY-ESO soluble “de tipo salvaje” y HLAA2 NY-ESO.

Las figuras 31a y 31b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (clon 1) y HLAA2 Tax.

30 Las figuras 32a y 32b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (clon 111) y HLAA2 Tax.

35 Las figuras 33a y 33b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (clon 89) y HLAA2 Tax.

La figura 34 muestra un gráfico Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (que contiene mutaciones del clon 71 y el clon 134) y HLAA2 Tax.

40 La figura 35 muestra un gráfico Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (que contiene mutaciones en el clon 71 y el clon land β G102→A) y HLAA2 Tax.

Las figuras 36a a 36c muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (que contiene mutaciones del clon 89 y el clon 134) y HLAA2 Tax.

45 Las figuras 37a y 37b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 soluble mutante (que contiene mutaciones del clon 71 y el clon 89) y HLAA2 Tax.

50 La figura 38 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena β de los siguientes clones de TCR A6: 38a - salvaje, 38b - Clon 134, 38c - Clon 89, 38d - Clon 1 y 38e - Clon 111.

Los residuos mutados se muestran en negrita, los residuos entre corchetes son residuos alternativos que pueden estar presentes en un sitio concreto.

55 Figuras 39A y 39B I

Ejemplo 1

60 *Diseño de cebadores y mutagénesis de las cadenas α y β del TCR A6 Tax para introducir los residuos de cisteína requeridos para la formación de un nuevo puente disulfuro entre cadenas*

Para producir la mutación de treonina 49 del A6 Tax del exón 1 en TRAC*01 a cisteína se diseñaron los siguientes cebadores (la mutación se muestra en minúsculas)

65 5'-C ACA GAC AAA **tg**T GTG CTA GAC AT (SEC ID 35)

5'-AT GTC TAG CAC **Aca** TTT GTC TGT G (SEC ID 36)

ES 2 327 229 T3

Para producir la mutación de la serina 57 del A6 Tax del exón 1 en TRBC1*01 y TRBC2*01 a cisteína se diseñaron los siguientes cebadores (la mutación se muestra en minúsculas);

5' -C ACT GGG GTC tGC ACA GAC CC (SEC ID 37)

5' -GG GTC TGT Gca GAC CCC ACT G (SEC ID 38)

Mutagénesis por PCR

Los plásmidos de expresión que contienen los genes para la cadena α o β del TCR A6 Tax se mutaron usando los cebadores de la cadena α o los cebadores de la cadena β respectivamente, del siguiente modo. Se mezclaron 100 ng de plásmido con 5 μ l de dNTP 10 mM, 25 μ l de 10x tampón Pfu (Stratagene), 10 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene) y el volumen final se ajustó hasta 240 μ l con H₂O. 48 ml de esta mezcla se suplementaron con cebadores diluidos para dar una concentración final de 0,2 μ M en un volumen de reacción final de 50 μ l. Tras una etapa de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95°C, la mezcla de reacción se sometió a 15 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), renaturalización (55°C, 60 s) y elongación (73°C, 8 min) en una máquina de PCR Hybaid PCR express. A continuación el producto se digirió durante 5 horas a 37°C con 10 unidades de la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs). 10 ml de la reacción digerida se transformaron en bacterias XL1-Blue competentes y se cultivaron durante 18 horas a 37°C. Se escogió una única colonia y se cultivó durante la noche en 5 ml de TYP + ampicilina (16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 2,5 g/l de K₂HPO₄, 100 mg/l de ampicilina). El ADN plasmídico se purificó en columna mini-prep Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la secuencia se verificó mediante secuenciación automática en el centro de secuenciación del Departamento de Bioquímica, Universidad de Oxford. Las secuencias mutadas de ácido nucleico y de aminoácidos se muestran en las Figuras 1a y 2a para la cadena α y las figuras 1b y 2 b para la cadena β .

Ejemplo 2

Construcción de vectores de presentación en fago y clonación de las cadenas α y β del TCR A6 en los vectores fagemido

Con el fin de presentar un TCR A6 heterodimérico que contenga un puente disulfuro no nativo entre cadenas sobre las partículas de fago filamentoso, se construyeron vectores fagemido para la expresión de proteínas de fusión que comprenden el TCR A6 heterodimérico que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas con una proteína de la cubierta del fago. Estos vectores contienen un origen Puc19, un origen M13, un gen bla (de resistencia a ampicilina), promotor/operador Lac y un sitio de unión CAP. El diseño de estos vectores se resume en la Figura 3, que describe vectores que codifican las proteínas de fusión gp3-cadena β de TCR A6 o gp8-cadena β de TCR A6 además de la cadena α del TCR A6 soluble. Los vectores de expresión que contienen las secuencias de ADN de las cadenas α y β mutadas del TCR A6 que incorporan los residuos de cisteína adicionales requeridos para la formación de un nuevo puente disulfuro entre cadenas preparado en el Ejemplo 1 y, como se muestra en las figuras 1a y 1b, se usaron como la fuente de las cadenas α y β del CTR A6 para la producción de un fagemido que codifica este TCR. La secuencia completa de ADN del constructo del fagemido (pEX746) utilizado se indica en la figura 4.

Los procedimientos de clonación molecular para construir los vectores se describe en "Molecular cloning: A laboratory manual, by J. Sambrook y D. W. Russell".

Los cebadores enumerados en la tabla 1 se usan para la construcción de los vectores. Un ejemplo del programa de la PCR es 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 53°C durante 5 segundos y 72°C durante 90 segundos, seguido por 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos, y después mantener a 4°C. La ADN polimerasa Expand hifidelity Taq se adquiere en Roche.

TABLA 1

Cebadores usados para la construcción de los vectores de presentación en fago de TCR A6

Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'
YOL1	TAATAATACGTATAATAATATTCTATTTCAAG GAGACAGTC (SEQ ID 39)

ES 2 327 229 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

YOL2	CAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAGGTATT TCATTTATGACTGTCTCCTTGAAATAG (SEQ ID 40)
YOL3	CtaCGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCG GCCAGCCGGCCATGGCccag (SEQ ID 41)
YOL4	GTTCTGCTCCACTTCCTTCTGGGCCATGGCCG GCTGGGCCG (SEQ ID 42)
YOL5	CAGAAGGAAGTGGAGCAGAAC (SEQ ID 43)
YOL6	CTTCTTAAAGAATTCTTAATTAACCTAGGTTA TTAGGAACTTTCTGGGCTGGGGAAG (SEQ ID 44)
YOL7	GTTAATTAAGAATTC TTTAAGAAGGAGATATA CATATGAAAAAATTATTATTCCGAATTC (SEQ ID 45)
YOL8	CGCGCTGTGAGAATAGAAAGGAACACTAAG GAATTGCGAATAATAATTTTTTCATATG (SEQ ID 46)
YOL9	CTTCTATTCTCACAGCGCGCAGGCTGGTGTCTC ACTCAGAC (SEQ ID 47)
YOL10	ATGATGTCTAGATGCGGCCGCGTCTGCTCTAC CCCAGGCCTC (SEQ ID 48)
YOL11	GCATCTAGACATCATCACCATCATCACTAGAC TGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAAC (SEQ ID 49)

YOL12

CTAGAGGGTACCTTATTAAGACTCCTTATTAC

GCAGTATG (SEQ ID 50)

5

Ejemplo 3

Expresión de fusiones de la proteína de la cubierta bacteriana y el TCR A6 heterodimérico en E. coli

Con el fin de validar el constructor del Ejemplo 2 se prepararon partículas de fago que presentan el TCR A6 heterodimérico que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas usando los procedimientos descritos anteriormente para la generación de partículas de fago que presentan scFv de anticuerpo (Li y col., 2000, Journal of Immunological Methods 236: 133-146) con las modificaciones siguientes. Se usaron células *E. coli* XL-1-Blue que contienen fagemido pEX746:A6 (es decir, el fagemido que codifica la cadena α del TCR A6 soluble y una cadena β d el TCR A6 fusionada con la proteína gIII del fago producida por se ha descrito en el Ejemplo 2) para inocular 5 ml de Lbatg (caldo Lennox L que contiene 100 mg/ml de ampicilina, 12,5 μ g/ml de tetraciclina y 2% de glucosa) y, después, el cultivo se incubó con agitación a 37°C durante la noche (16 horas). Se usaron 50 μ l del cultivo durante la noche para inocular 5 ml de TYPatg (TYP es 16 g/l de peptona, 16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 2,5 g/l de K_2HPO_4) y, después, el cultivo se incubó con agitación a 37°C hasta $DO_{600nm} = 0,8$. Al cultivo se añadió el fago colaborador M13 K07 hasta la concentración final de 5×10^9 ufp/ml. A continuación, el cultivo se incubó a 37°C sin variar durante treinta minutos y, después, con agitación a 200 rpm durante otros 30 minutos. A continuación, el medio del cultivo anterior se cambió a TYPak (TYP que contiene 100 mg/ml de ampicilina, 25 mg/ml de kanamicina), después el cultivo se incubó a 25°C con agitación a 250 rpm durante 36 horas a 48 horas. Después, el cultivo se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se almacenó a 4°C para su posterior concentración o análisis.

La proteína de fusión de la proteína de la cubierta filamentosa y el TCR A6 heterodimérico que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas se detectó en el sobrenadante mediante transferencia de tipo western. En cada calle de un gel de SDS-PAGE se cargaron aproximadamente 10^{11} ufc de partículas de fago en tampón de carga tanto reductor como no reductor. Las proteínas separadas se sondaron con anticuerpo primario con un AcMo de anti M13 gIII, seguido por un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). La actividad de HRP se detectó después con un kit de sustrato Opti-4CN de Bio-Rad (Figura 5). Estos datos indicaron que el TCR A6 con puente disulfuro del clon 1 está fusionado con la proteína de la cubierta del fago filamentoso, la proteína gIII.

Ejemplo 4

Detección de TCR A6 heterodimérico funcional que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas sobre las partículas de fago filamentoso

La presencia de TCR A6 funcional (unión a HLA-A2-tax) presentado sobre las partículas de fago se detectó usando un método de ELISA para fagos.

ELISA fago-TCR

La unión de las partículas de fago que presentan TCR A6 a péptido-MHC inmovilizado en el ELISA se detecta con antisuero primario anti-fd de conejo (SIGMA), seguido por Ac anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (FA) (Sigma). Los sitios de unión a proteína no específicos en las placas se puede bloquear con 2% de MPBS o 3% de BSA-PBS.

Materiales y reactivos

1. Tampón de recubrimiento, PBS
2. PBS: NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM
3. MPBS, 3% marvel-PBS
4. PBS-Tween: PBS, 0,1% Tween-20
5. Solución sustrato, Sigma FAST pNPP, n° de cat. N2770

65

ES 2 327 229 T3

Procedimiento

1. Aclarar los pocillos revestidos con neutravidina dos veces con PBS.
- 5 2. Añadir 25 μ l de biotina-HLA-A2 Tax o biotina-HLA-A2 NYESO en PBS a una concentración de 10 μ g/ml e incubar a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos.
3. Aclarar los pocillos dos veces con PBS
- 10 4. Añadir 300 μ l de 3% Marvel-PBS e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Mezclar la suspensión TCR-Fago con 1 volumen de 3% de marvel-PBS e incubar a temperatura ambiente.
5. Aclarar los pocillos dos veces con PBS
- 15 6. Añadir 25 μ l de la mezcla de fago-TCR A6/Marvel-PBS, incubar en hielo durante 1 hora
7. Aclarar los pocillos tres veces con PBS-Tween helado y tres veces con PBS helado.
8. Añadir 25 μ l de anticuerpo anti-fd de conejo helado diluido a 1:1000 en Marvel PBS e incubar en hielo
20 durante 1 hora
9. Aclarar los pocillos tres veces con PBS-Tween helado y tres veces con PBS helado.
10. Añadir 25 μ l de conjugado de FA-AcMo anti-conejo helado diluido a 1:50.000 en Marvel PBS e incubar
25 en hielo durante 1 hora
11. Aclarar los pocillos tres veces con PBS-Tween helado y tres veces con PBS helado.
12. Añadir a cada pocillo 150 μ l de fosfatasa alcalina amarilla y leer la señal a 405 nm.
- 30

Los resultados presentados en la figura 6 indican que el clon 1 producía una partícula de fago que presentaba un TCR A6 que puede unirse específicamente a su pMHC conocido. (HLA-A2 Tax).

35 El análisis de la secuencia de ADN de este TCR A6 presentado reveló la presencia de un codón de terminación “ópalo” en la cadena β del TCR no presente en la correspondiente secuencia del constructo del vector de expresión del ejemplo 2. Este codón es “leído” por los ribosomas de la cepa de *E. coli* utilizada con una frecuencia baja y tiene como resultado la inserción de un residuo de triptófano en este punto y un nivel total muy reducido de la expresión de la cadena β de longitud completa. A partir de esta observación se ha deducido que sólo las células que expresaban esta
40 secuencia del TCR A6 mutado habían sobrevivido a los ciclos de cultivo del ejemplo 3 y que, por tanto, los niveles elevados de expresión de TCR A6 que se habían predicho en el vector de expresión original eran tóxicos para las células huésped.

45 Ejemplo 5

Presentación al ribosoma de TCR de cadena sencilla (scTCR)

50 *Construcción de vectores para scTCR de presentación al ribosoma para usar en la generación de moldes para PCR de presentación al ribosoma*

Los constructos de presentación al ribosoma se clonaron en el plásmido de ADN fácilmente disponible Puc19, con el fin de generar un molde para PCR de ADN sin errores y estable a partir del cual realizar los siguientes experimentos de presentación al ribosoma. La construcción del vector se llevó a cabo en dos etapas para evitar el uso de cebadores
55 oligonucleotídicos grandes (con sus problemas de error asociados). El constructo final de presentación al ribosoma ADN scTCR A6-Kappa se muestra en forma esquemática en la figura 7a y las secuencias de ADN y proteica se muestran en la Figura 7b. Este constructo puede escindirse de pUC19 como un digerido doble con Pst1/EcoR1.

Los procedimientos de clonación molecular para construir los vectores se describe en “Molecular cloning: A laboratory manual, by J. Sambrook y D. W. Russell”. Los cebadores enumerados en la tabla 2 se usan para la construcción de los vectores. El programa de la PCR utilizado fue el siguiente -1 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, seguido por 25
60 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 120 segundos, seguido por 1 ciclo de 72°C durante 5 minutos, y después mantener a 4°C. La ADN polimerasa Pfu se adquiere en Stratagene. Los cebadores oligonucleotídicos se describen en la tabla 2.

65

ES 2 327 229 T3

Construcción de pUC19-T7- Etapa 1

La construcción de pUC19-T7 se describe más adelante, la construcción tiene como resultado un vector pUC19-T7 que contiene una región promotora de T7 seguida por una región espaciadora corta y una secuencia eucariótica óptima Kozak. Esto es parte esencial del constructo de presentación al ribosoma, tal como se requiere para el inicio de la transcripción de cualquier secuencia unida en lisados de reticulocitos de conejo. Las secuencias para la presentación al ribosoma como el scTCR A6-Ckappa se pueden ligar en el vector pUC19-T7 entre los sitios de restricción Nco1 y EcoR1.

Cantidades equimolares del cebador Rev-link y For-link se hibridaron mediante calentamiento hasta 94°C durante 10 minutos y enfriamiento lento de la reacción hasta la temperatura ambiente. Esto tiene como resultado la formación de un complejo de ADN bicatenario que se puede ver más adelante.

5 ' AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGGCCACCATGG
CGTCGATTATGCTGAGTGATATCCTTGTCCGGTGGTACCCTAG 3 '
(SEC ID 51)

La región 5' contiene un extremo adherente en bisagra y complementario a un sitio de restricción HindIII, mientras que el extremo 3' contiene un extremo adherente que es complementario a un sitio de restricción BamHI. Los oligonucleótidos hibridados se ligaron en el Puc19 sometido a digestión doble con Hind III/BamHI, que se había purificado mediante electroforesis en gel de agarosa, fragmentado y purificados después con el kit de extracción en gel Qiagen.

Las uniones se transformaron en *E. coli* XL1-BLUE. Los clones de Puc19-T7 individuales se secuenciaron para confirmar la presencia de la secuencia correcta.

La secuencia se muestra en la figura 8.

Construcción del vector Kappa-C-scTCR A6- Etapa 2

La construcción de la secuencia de ADN monocatenario de scTCR A6-c-Kappa requiere la generación de tres fragmentos de PCR que, después, deben ensamblarse en un fragmento de scTCR A6-C-Kappa. Los fragmentos constan de (a) la región variable de la cadena alfa del TCR A6 flanqueada por un sitio Nco1 en la región 5' y una sección de espaciador de glicina serina en la región 3' flanqueada por un sitio de restricción BamHI. Este producto se generó mediante una PCR estándar del vector pEX202 con los cebadores 45 y 50 (véase la Tabla 2). Fragmento (b) región constante y variable de beta del TCR A6 flanqueada por un sitio de restricción BamHI en la región 5', seguida por una sección de espaciador de glicina serina. Este producto se generó mediante una PCR estándar del vector pEX207 con los cebadores 72 y 73 (véase la Tabla 2). Fragmento (c). Porción de una región kappa-C humana generada por una PCR estándar del vector p147 con los cebadores 61-60 (véase la Tabla 2). Todos los productos de la PCR se pasaron en un gel de agarosa TBE al 1,6% y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen. Los fragmentos (b) y (c) se fusionaron mediante PCR de superposición estándar a través de la complementariedad en sus secuencias de cebadores 73 y 61 (véase la tabla 2). La PCR se llevó a cabo a través de los cebadores 72 y 60 (véase la tabla 2). Los productos de la PCR se pasaron en un gel de agarosa TBE al 1,6% y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen.

Este fragmento se denomina (d).

El fragmento (a) se sometió a digestión doble con Nco1 y BamHI, mientras que el fragmento (d) se sometió a digestión doble con BamHI y EcoR1. pUC19-T7 se sometió a digestión doble con Nco1 y EcoR1. Todos los productos de ADN digeridos se pasaron en un gel de agarosa TBE al 1,2% y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen. El pUC19-T7 digerido, los fragmentos (a) y (d) se ligaron y transformaron en *E. coli* XL1-BLUE. Los transformantes se secuenciaron para confirmar la secuencia correcta. La secuencia del constructo de presentación al ribosoma TCR A6-C Kappa que se clonó en pUC19 se muestra en la figura 9 flanqueada por sus sitios Pst1 y EcoR1.

ES 2 327 229 T3

TABLA 2

Oligonucleótidos usados (Adquiridos en MWG)	
5	Rev-Link 5'GATCCCATGGTGGCCTGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCTGC (SEC ID 52)
10	For-Link 5'AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGGCCACCATGG (SEC ID 53)
15	45-A6 5'CCACCATGGGCCAGAAGGAAGTGGAGCAGAACTC (SEC ID 54)
20	7 A6- Beta(RT-PCR)(a) 5'CGAGAGCCCGTAGAACTGGACTTG (SEC ID 55)
25	49-A6- BamH1-F 5'GTGGATCCGGCGGTGGCGGGTCAACGCTGGTGTCCTCAGACCCC (SEC ID 56)
30	50-A6- BamH1-R 5'CCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCGGTGACCACAACCTGGGTCCCTG (SEC ID 57)
35	60-Kappa- rev-EcoR1 5' CTGAGAATTCTTATGACTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEC ID 58)
40	61-Betac- Kappa-for 1 5' TGACGAATTCTGACTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEC ID 59)
45	71 T7- Cebador 5' AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGG (SEC ID 60)
50	72 A6-beta 5'GGCCACCATGGGCAACGCTGGTGTCCTCAGACCCC (SEC ID 61)
55	73-A6-cons- rev 5'TGAACCGCCTCCACCGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGCG (SEC ID 62)
60	75 Kappa- rev 5' TGA CTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEC ID 63)

65

ES 2 327 229 T3

Demostración de la producción de scTCR A6-C-Kappa mediante transcripción y traducción in vitro

Preparación del producto de la PCR de scTCR A6-C-Kappa para la transcripción y traducción in vitro

5 En el presente documento, los inventores describen la síntesis de scTCR A6-C-Kappa mediante transcripción y traducción *in vitro* en presencia de lisina biotilada y su posterior detección mediante transferencia de tipo western y detección con estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina.

10 El producto de la PCR de scTCR A6-C-Kappa se preparó en una reacción de PCR estándar usando el vector de scTCR A6-Kappa como molde y los cebadores de PCR 71 y 60. El cebador 60 contiene un codón de terminación para permitir la liberación del scTCR desde el ribosoma. La Pfu polimerasa (Stratagene) se usó para incrementar la fidelidad durante la síntesis en PCR. Los productos de la PCR se pasaron en un gel de agarosa TBE al 1,6% y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen. Las reacciones de transcripción y traducción se llevaron a cabo usando el kit de transcripción traducción Ambion PROTEINscript II
15 Linked n° de catálogo 12080-1287 con 300 ng del producto de la PCR descrito en lo que antecede. Se establecieron tres reacciones de transcripción traducción de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una modificación fue la adición de lisina biotilada del sistema de detección no radioactiva de la traducción Transcend™.

20 Reacción 1 scTCR A6-C-Kappa 300 ng con 2 μ l de lisina biotilada

Reacción 2 scTCR A6-C-Kappa 300 ng sin 2 μ l de lisina biotilada

Reacción 3 No control de ADN con 2 μ l de lisina biotilada.

25 Dos microlitros de cada reacción se pasaron en un gel de SDS-PAGE de gradiente 4-20% Novex (Invitrogen). Además, también se pasaron una serie de diluciones de un TCR biotilado control. El gel se transfirió y las proteínas se detectaron con fosfatasa alcalina con estreptavidina y, posteriormente, se desarrolló coloriméricamente con sustrato estabilizado Western Blue® para fosfatasa alcalina tal y como se describe en el protocolo del sistema de detección no radioactiva de la traducción Transcend™. La transferencia de tipo western se muestra en la figura 10.

30 En el control sin ADN y la reacción de scTCR A6-C-Kappa sin lisina biotilada no se puede ver ninguna banda de aproximadamente el tamaño correcto como cabía esperar, mientras que en la reacción de scTCR A6-C-Kappa en presencia de lisina biotilada se puede ver una banda de aproximadamente el tamaño correcto. Esto demuestra la síntesis del scTCR A6-C-Kappa mediante transcripción y traducción *in vitro*.

Preparación del producto de la PCR de presentación en ribosoma de scTCR A6-C-Kappa

35 El producto de la PCR de scTCR A6-C-Kappa se preparó en una reacción de PCR estándar usando el vector scTCRA6-Kappa como molde y los cebadores para PCR 71 y 75 (véase la tabla 2). El cebador 75 no contiene un codón de terminación. La Pfu polimerasa (Stratagene) se usó para aumentar la fidelidad durante la síntesis en PCR.

40 Los productos de la PCR se pasaron en un gel de agarosa TBE al 1,6% y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen.

Procedimiento de presentación en ribosoma

Transcripción y traducción de scTCR A6-G-Kappa

45 Las reacciones de transcripción/traducción se llevaron a cabo usando el kit de transcripción traducción Ambion PROTEINscript II Linked (número de catálogo 1280-1287).

Reacciones de transcripción

50 Las siguientes reacciones de transcripción se establecieron en tubos no adherentes Ambion de 0,5 ml (n° de catálogo 12350).

Contenido	Tubo 1 (Normal A6)	Tubo 2 (Control)
Agua	4,53 μ l	5,7 μ l
Molde (producto de PCR)	Producto de PCR scTCR A6-C-Kappa 1,17 μ l (300 ng)	Sin ADN

ES 2 327 229 T3

5	5X mezcla de transcripción	2 μ l	2 μ l
	Mezcla de enzimas	2 μ l	2 μ l
	Superasina _{Ranse}	0,3 μ l	0,3 μ l
10	inhibitorambion		
	Volumen final	10 μ l	10 μ l

Los tubos se incubaron a 30°C durante 60 minutos en un bloque de PCR sin la tapa caliente.

Reacciones de traducción

Las reacciones de traducción siguientes se realizaron en tubos no adherentes Ambion de 0,5 ml.

Contenido	1 (A6 normal)	2 (Control)
Lisado de reticulocitos	105 μ l	105 μ l
Acetato de Mg 25 mM	3 μ l	3 μ l
Mezcla de traducción	7,5 μ l	7,5 μ l
Metionina	7,5 μ l	7,5 μ l
Agua	18 μ l	18 μ l
Superasin _{Inhibidor Rease}	3 μ l	3 μ l
Reacción de transcripción	Tubo 1 anterior de 6 μ l	Tubo 2 anterior de 6 μ l

Cada tubo contiene suficiente para 3x50 μ l selecciones. Los tubos se mezclaron e incubaron a 30°C durante 60 minutos en un bloque de PCR sin la tapa caliente. Tras 30 minutos se añadieron 3 unidades de RQ1 ADNasa sin ARNasa (Promega) para destruir el molde de ADN original en el tubo 1 y 3 unidades de RQ1 ADNasa sin ARNasa (Promega) en el tubo 2. Tras 60 minutos, se añadieron 18 μ l de solución de heparina a la reacción de traducción 2 y 18 μ l de solución de heparina a la reacción de traducción 1. Las muestras se almacenaron en hielo listas para la selección frente a las perlas recubiertas con HLA.

Recubrimiento de las perlas magnéticas

20 μ l de partículas magnéticas con estreptavidina resuspendidas (Roche n° de catálogo 1641778) se transfirieron a un tubo de eppendorf estéril de 1,5 ml sin ARNasa. Las perlas se inmovilizaron con un Separador de partículas magnéticas (Roche, n° de catálogo 1641794) y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las perlas se lavaron con 100 μ l de 1 X PBS sin ARNasa (10 x PBS Ambion n° catálogo 9624, Ambion H₂O n° catálogo 9930). Las perlas se inmovilizaron y el sobrenadante se eliminó.

Se llevaron a cabo un total de 3 lavados con PBS. Las perlas se resuspendieron en 20 μ l de PBS y el contenido se repartió de forma uniforme entre dos tubos (10 μ l en cada uno). Un tubo se usará para producir perlas bloqueadas de control y los otros tubos se usaron para producir perlas recubiertas con HLA-A2-Tax.

Al tubo con las perlas control se añadieron 80 μ l de solución de BSA/Biotina y se mezcló. La solución de BSA/Biotina se preparó del siguiente modo. A 990 μ l de PBS 0,1% de BSA (Ambion Ultrapure n° de catálogo 2616) se añadieron 10 μ l de una solución con base Tris 0,2M y biotina 0,1M. Asimismo, se añadieron 20 μ l de solución de heparina (138 mg/ml de heparina (Sigma H-3393) en 1 x PBS y la solución se mezcló. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con mezclado intermitente. A continuación, las perlas se lavaron tres veces con 100 μ l de PBS y se resuspendieron en 10 μ l de PBS, 0,1% de BSA.

ES 2 327 229 T3

Las perlas recubiertas con HLA-TAX se prepararon del siguiente modo. A los 10 μ l de las perlas se añadieron 40 μ l de HLA-A2 Tax (1,15 mg/ml preparados como se describe en el documento WO99/60120) y se mezclaron. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se añadieron 20 μ l de BSA 50 mg/ml Ambion nº de catálogo 2616 y 20 μ l de solución de heparina (véase en lo que antecede) y se mezclaron. Las perlas se incubaron durante otros 45 minutos y después se añadieron 20 μ l de solución de BSA/biotina. A continuación, las perlas se lavaron tres veces con 100 μ l de PBS y se resuspendieron en 10 μ l de PBS, 0,1% de BSA.

Panning con perlas magnéticas

La reacción de traducción de scTCR A6 se dividió en tres alícuotas de 50 μ l y cada alícuota recibió bien 2 μ l de las perlas siguientes:

Control (sin HLA)

HLA-A2-Tax

HLA-A2-Tax más 10 μ g de scTCR A6 soluble

También se realizó una reacción de traducción control y se dividió en tres alícuotas de 50 μ l y cada alícuota recibió bien 2 μ l de las perlas siguientes

Control (sin HLA)

HLA-A2-Tax

HLA-A2-Tax más 10 μ g de scTCR A6 soluble

Esto dio un total de seis tubos. Los tubos se incubaron en un bloque de PCR a 5°C durante 60 minutos con mezclado intermitente. A continuación, las perlas se lavaron tres veces con 100 μ l de tampón helado (PBS, acetato de Mag 5 mM, 0,2% de Tween 20 (Sigma sin ARNasa). Cada alícuota de perlas se resuspendió después en 50 μ l de 1 x RQ1 tampón de digestión ADNasa que contiene 1 μ l (40 U) de superasen y 1 μ l (1 U) de RQ1 ADNasa. Las perlas se incubaron en un bloque de PCR durante 30 minutos a 30°C.

A continuación, las perlas se lavaron tres veces con 100 μ l de tampón helado (PBS, acetato de Mag 5 mM, 0,2% de Tween 20) y una vez con H₂O helada. Las perlas se resuspendieron en 10 μ l de H₂O sin ARNasa. Después, las perlas se congelaron listas para la RT-PCR.

RT-PCR del ARNm del scTCR A6-C-Kappa en perlas rescatadas de las reacciones de presentación en ribosoma

Las reacciones de RT-PCR en las perlas se llevaron a cabo usando el kit Titan de un tubo para RT-PCR, catálogo 855476, como se describe en los protocolos de los fabricantes. Dos microlitros de perlas se añadieron a cada reacción de RT-PCR junto con los cebadores 45 y 7 y 0,3 μ l de Superasen inhibidor de la ARNasa. Para cada reacción de RT-PCR se estableció una segunda PCR que difirió únicamente por el hecho de que no había presencia de transcriptasa inversa, sólo la polimerasa de alta fidelidad de Roche. Esta segunda reacción sirvió como control para la contaminación de ADN. Además, se estableció un control positivo de la RT-PCR usando 1 ng del vector scTCR A6-C-Kappa.

Las reacciones se ciclaron del siguiente modo. Se llevó a cabo una etapa de RT-PCR mediante incubación de las muestras a 50°C durante 30 minutos, seguida por la inactivación de la transcriptasa inversa mediante incubación a 94°C durante 3 minutos en un bloque de PCR. Las reacciones fueron ciclos de PCR del siguiente modo, para un total de 38 ciclos:

94°C 30 segundos

55°C 20 segundos

68°C 130 segundos

La reacción de PCR se terminó mediante incubación a 72°C durante 4 minutos.

Durante todas las etapas de presentación al ribosoma se tomaron grandes precauciones para evitar la contaminación con ARNasa. Las reacciones de Rt-PCR y de CPR se realizaron en un gel de agarosa con TBE al 1,6% que se puede ver en la figura 11. El análisis del gel muestra que no hay contaminación con ADN y que todos los productos de la PCR derivan de ARNm. La banda de ADN del tamaño correcto en la calle 2 demuestra que el scTCR A6-C-Kappa presentado en el ribosoma se seleccionó mediante perlas recubiertas con HLA-A2-Tax. La calle 3 muestra que los inventores pueden inhibir esta selección específica de scTCR A6-C-Kappa presentado en el ribosoma mediante la adición de scTCRA6 soluble. La reducción significativa en la intensidad de la banda de la calle 3 respecto a la muestra sin inhibir de la calle 2 lo demuestra. No se pudo mostrar ninguna unión de scTCRA6-C-Kappa presentado en el ribosoma frente a las perlas control no recubiertas con HLA.

ES 2 327 229 T3

Ejemplo 6

Análisis de la secuencia de clones de TCR A6 presentados sobre partículas de fago y procedimientos para mejorar las características de presentación

Tras la construcción de vectores para presentar TCR A6 sobre fago mediante PCR y clonación molecular, los clones bacterianos que pueden producir partículas de fago que presenten TCR A6 se sometieron a detección selectiva por medio de ELISA para fagos tal y como se describe en el ejemplo 4. Se identificaron tres clones diferentes que dieron unión específica a HLA-A2-tax en el ensayo de unión ELISA. Todos estos clones contenían mutaciones en el ADN de TCR A6 “de tipo salvaje” o en las secuencias reguladoras asociadas, que se describen en la tabla siguiente:

Clones funcionales de la detección selectiva de TCR A6 presentado sobre fago

Nombre	Característica	
Clon 7	El tercer sitio de unión al ribosoma, que se localiza en frente del gen $v\beta$, está mutado de <u>AAGGAGA</u> a <u>AAGGGGA</u> .	
Clon 9	En $v\beta$ CDR3 se introdujo un codón ópalo.	Secuencia completa de ADN y de aminoácidos en las figuras 12a y 12 b.
Clon 49	En $v\beta$ FR1 se introduce un codón ámbar. Esta mutación introduce una mutación “silenciosa” que no afecta a la secuencia de aminoácidos resultante	Secuencia completa de ADN en las figuras 13a

Todos estos clones contenían mutaciones que probablemente sean la causa de una reducción en los niveles de expresión de la cadena β del TCR A6. Se dedujo que los clones de expresión baja eran seleccionados sobre los clones de expresión alta como resultado de la toxicidad celular causada por los niveles elevados de expresión del TCR.

Ejemplo 7

Mutagénesis de las regiones CDR3 del CTR A6

Las regiones CDR3 del TCR A6 eran la diana para la introducción de mutaciones para investigar la posibilidad de generar mutantes de alta afinidad.

Se usó la PCR con solapamiento para modificar la secuencia de las regiones CDR3 de α y β para introducir dos sitios de restricción únicos, *HindIII* para la cadena α , con oligos de YOL54, 5' CAGCTGGGGGAAGCTTCAGTTTG GAGCAG3' (SEC ID 64) y YOL55, 5' CTGCTCCAAACTGAAGCTTCCCCAGCTG3' (SEC ID 65), y Xho I para la cadena β , con oligos de YOL56 5' GTACTTCTGTGCCTCGAGGCCGGGACTAG3' (SEC ID 66) y YOL57 5' CTAGTCCCGGCTCGAGGCACAGAAGTAC3' (SEC ID 67).

La PCR se usó para introducir mutaciones para la madurez de la afinidad. El clon 9 del TCR A6 (que incorpora un codón ópalo introducido en la secuencia de la CDR3 de la cadena β) se usó como fuente del ADN molde, y las cadenas del TCR se amplificaron con los cebadores de la mutación (que se detallan en la tabla siguiente) y YOL22 5' CATTTCAGGGATAGCAAGC3' (SEC ID 68) (cadena β) o YOL13 5' TCACACAGGAAACAGCTATG3' (SEC ID 69) (cadenas α).

ES 2 327 229 T3

Cebadores para la introducción de la mutación en CDR3 de la cadena β y la cadena α de A6

Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'
YOL59	TGTGCCTCGAGGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNN NKCGACCAGAGCAGTACTTCG (SEQ ID 70)
YOL60	TGTGCCTCGAGGCCGNNKNNKNNKNNKNNKNN NKNNKCCAGAGCAGTACTTCGGGC (SEQ ID 71)
YOL61	TGTGCCTCGAGGCCGNNKNNKNNKNNKNNKNN NKNNKCGACCAGAGCAGTACTTCG (SEQ ID 72)
YOL62	TGTGCCTCGAGGCCGNNKNNKNNKNNKNNKNN NKNNKGGAGGGCGACCAGAGCAG (SEQ ID 73)
YOL63	TGTGCCTCGAGGCCGGGANNNKNNKNNKNNKNN NKNNKNNKGGGCGACCAGAGCAGTAC (SEQ ID 74)
YOL68	TGTGCCTCGAGGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNN NKCCAGAGCAGTACTTCGggc (SEQ ID 75)
YOL69	TGTGCCTCGAGGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNN NKGAGCAGTACTTCGggccg (SEQ ID 76)
YOL70	TGTGCCTCGAGGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNN NKAGTACTTCGggccgggc (SEQ ID 77)
YOL71	TGTGCCTCGAGGccgNNKNNKNNKNNKNNKg ggCGACCAGAGCAGTACTTCG (SEQ ID 78)
YOL58	AACTGAAGCTTMNNMNNMNNMNNMNNMNT GTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 79)

ES 2 327 229 T3

YOL72	AAACTGAAGCTTMNNMNNNgctgtcMNNT GTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 80)
YOL73	AAACTGAAGCTTMNNMNNMNNNgctgtcM NNTGTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 81)
YOL74	AAACTGAAGCTTMNNMNNNgctgtcMNA ACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 82)

Los fragmentos de la cadena α se digirieron con *Nco I* y *HindIII* y se volvieron a purificar usando un kit Qiagen y el vector se preparó mediante digestión del clon 9 con *Nco I* y *HindIII*, seguido por purificación en gel usando un kit Qiagen.

Los fragmentos de la cadena β se digirieron con *Xho I* y *Not I* y se volvieron a purificar usando un kit Qiagen y el vector se preparó mediante digestión del clon 9 con *Xho I* y *Not I*, seguido por purificación en gel usando un kit Qiagen. Los insertos y vectores purificados en una proporción molar de 3:1 se mezclaron con tampón de ligasa T4, ligasa T4 y agua sin nucleasa. Las uniones se llevaron a cabo en baño de agua a 16°C durante la noche. Para cada biblioteca de mutaciones, un total de 0,5 a 1 μ g de productos ligados purificados se sometieron a electroporación en *E. coli* TG1 en una proporción de 0,2 μ g de ADN por 40 μ l de células competentes en electroporación (Stratagen) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante. Tras la electroporación, las células se resuspendieron inmediatamente con 960 μ l de medio SOC a 37°C y se sembraron en placas de cultivo tisular de 244 mm x 244 mm que contienen YTE (15 g de Bacto-Agar, 8 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura en 1 litro) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa. La placa se incubó a 30°C durante la noche. A continuación, las células se rasparon de las placas con 5 ml de DYT (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 litro, en autoclave a 125°C durante 15 minutos) suplementado con glicerol al 15%.

Con el fin de fabricar partículas de fago que presenten el TCR A6, se inocularon 500 ml de DYTtag (DYT que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa) con de 500 a 1000 μ l de las reservas en la biblioteca. El cultivo se hizo crecer hasta que la DO (600 nm) alcanzó 0,5. 100 ml del cultivo se infectaron con el fago colaborador (M13 K07 (Invitrogen), o HYPER PHAGE (Progen Biotechnik, GmbH 69123 Heidelberg), y se incubó en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. El medio se reemplazó con 100 ml de DYTak (DYT que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 25 μ g/ml de kanamicina). A continuación el cultivo se incubó con agitación a 300 rpm y 25°C durante de 20 a 36 horas.

Ejemplo 8

Aislamiento de mutantes de TCR A6 de alta afinidad

El aislamiento de mutantes de TCR A6 de alta afinidad se llevó a cabo usando dos procedimientos diferentes.

El primer procedimiento implica seleccionar partículas de fago que presentan TCR A6 mutantes capaces de unirse al complejo HLA-A2 Tax usando inmunotubos Maxisorp (Invitrogen). Los inmunotubos estaban revestidos por de 1 a 2 ml de estreptavidina 10 μ g/ml en PBS durante la noche a temperatura ambiente.

Los tubos se lavaron dos veces con PBS y después se añadió 1 ml del complejo HLAA2 Tax biotinilado a 5 μ g/ml en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. El resto del protocolo para la selección de ligantes de alta afinidad es como se ha descrito anteriormente (Li y col. (2000) Journal of Immunological Methods 236: 133-146), a excepción de por las modificaciones siguientes. La selección se realizó en tres o cuatro rondas. Las concentraciones del complejo HLA-A2 Tax biotinilado fueron 5 μ g/ml para la primera ronda de selección, 0,5 μ g/ml para la segunda, 0,05 μ g/ml para la tercera y 0,005 μ g/ml para la cuarta ronda de selección. Los fagos colaboradores M13 K07 se usaron en las rondas una y dos, y el hiperfago se usó en las rondas de selección posteriores.

El segundo procedimiento utilizado fue la selección de partículas de fago que presentan TCR A6 mutantes capaces de unirse al complejo HLA-A2 Tax en solución. Las perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (DynaM280) se pre-lavaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las partículas de fago, que presentan TCR A6 mutado a una concentración de 10^{12} a 10^{13} ufc, se pre-mezclaron con el complejo HLA-A2 Tax biotinilado a concentraciones de 2×10^{-8} M, 2×10^{-9} M y 2×10^{-11} M para la primera, segunda, tercera y cuarta ronda de selecciones, respectivamente. La mezcla de partículas de fago que presentan TCR A6 y complejo HLA-A2 Tax se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con rotación suave, y las partículas de fago que presentan TCR A6 unidas al complejo HLA-A2 Tax biotinilado se capturaron usando 200 μ l (ronda 1) o 50 μ l (rodas 2, 3 y 4) de perlas magnéticas M280 recubiertas con estreptavidina. Tras la captura de las partículas de fago, las perlas se lavaron un total de diez veces (tres veces en PBS Tween 20, dos veces en PBS Tween 20 que contiene 2% de leche desgrasada en polvo, dos veces en PBS, una vez en PBS que contiene 2% de leche desgrasada en polvo y dos veces en PBS) usando un concentrador de partículas magnéticas Dynal. Tras un último lavado, las perlas se resuspendieron en 1 ml de trietilamina 100 mM recién preparada a pH 11,5 y se incubaron durante de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente con rotación

ES 2 327 229 T3

suave. Las partículas de fago eluidas desde las perlas se neutralizaron inmediatamente con 300 μ l de Tris-HCl 1M a pH 7,0. La mitad del eluato se usó para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 a una DO (600 nm)= 0,5 recién preparado para la amplificación de las partículas de fago seleccionadas de acuerdo con los procedimientos previamente descritos (Li y col., (2000) Journal of Immunological Methods 236: 133-146).

5 Tras una tercera o cuarta ronda de selección se escogieron 95 colonias de las placas y se usaron para inocular 100 μ l de DYTag en una placa de microtitulación de 96 pocillos. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante la noche. 100 μ l de DYTag se subinocularon después con de 2 a 5 μ l de los cultivos durante la noche y se incubaron a 37°C con agitación durante de 2 a 3 horas o hasta que el cultivo apareció turbio. Para infectar las células con el fago colaborador, se infectó el cultivo con 25 μ l de DYTag que contiene 5 x 10⁹ fagos colaboradores pfu y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

15 El medio se reemplazó con DYTak. Las placas se incubaron a 25°C durante de 20 a 36 horas con agitación a 300 rpm. Las células se precipitaron mediante centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se usaron para la detección selectiva de mutantes de TCR A6 de alta afinidad mediante ELISA de fagos competitivo del siguiente modo.

20 Los pocillos Nunc-Immuno Maxisorp revestidos con estreptavidina se aclararon dos veces con PBS. A cada pocillo se añadieron 25 μ l de complejo HLA-A2-Tax biotinilado 5 μ g/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos y fueron seguidos por dos lavados con PBS.

25 Los sitios de unión a proteínas no específicos en los pocillos se bloquearon mediante la adición de 300 μ l de 3% de leche desgrasada en PBS, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Con el fin de preparar partículas de fago que presenten el TCR A6 heterodimérico, las partículas de fago se mezclaron con 3% de leche desgrasada en PBS, que contiene HLA-A2-Tax 0, 20 y 200 nM, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El fago se añade a los pocillos revestidos con HLA-A2-Tax y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguida por 3 lavados con PBS que contiene 0,1% de Tween 20 y después 3 lavados con PBS. Las partículas de fago que presentan TCR unido se detectan con un anticuerpo anti-fd (Sigma) como se describe en el ejemplo 4.

30 Se identificaron varios mutantes de TCR A6 putativos de alta afinidad y las secuencias de CDR₃ se enumeran en las dos tablas siguientes junto con las correspondientes secuencias de tipo salvaje. Los codones de terminación ámbar (X) se encontraron en todos los mutantes de la cadena β y en un mutante de la cadena α .

Mutantes de la cadena β del TCR A6

35

Clon	Secuencia de CDR ₃
Tipo salvaje	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEC ID 83) A S R P G L A G G R P E Q Y (SEC ID 84)
134	GCCTCGAGGCCGGGGCTGATGAGTGCCTAGCCAGAGCAGTAC (SEC ID 85) A S R P G L M S A X P E Q Y (SEC ID 86)
86	GCCTCGAGGCCGGGGCTGAGGTCGGCGTAGCCAGAGCAGTAC (SEQ ID 87) A S R P G L R S A X P E Q Y (SEC ID 88)
87	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGCGTAG (SEQ ID 89) A S R P G L A G G R P E A X (SEC ID 90)
89	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGATTAG (SEC ID 91) A S R P G L A G G R P E D X (SEC ID 92)
85	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGATCAGTAG (SEQ ID 93) A S R P G L A G G R P D Q X (SEC ID 94)
83	GCCTCGAGGCCGGGTCTGTAGGCTGGGCGACCAGAGCAGTAC (SEC ID 95) A S R P G L X A G R P E Q Y (SEC ID 96)

65

ES 2 327 229 T3

1	GCCTCGAGGCCGGGGCTGGTTCCGGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEC ID 97) A S R P G L V P G R P E Q X (SEC ID 98)
2	GCCTCGAGGCCGGGGCTTGTGTCTGCTTAGCCAGAGCAGTAC (SEC ID 99) A S R P G L V S A X P E Q Y (SEC ID 100)
111	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCACATCCGTAG (SEC ID 101) A S R P G L A G G R P H P X (SEC ID 102)
125	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGATGCGTAG (SEC ID 103) A S R P G L A G G R P D A X (SEC ID 104)
133	GCCTCGAGGCCGGGTCTGATTAGTGCTTAGCCAGAGCAGTAC (SEC ID 105) A S R P G L I S A X P E Q Y (SEC ID 106)

Mutantes de la cadena α del TCR A6

Clon	CDR ₃
Tipo salvaje	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGAAGCTTCAG (SEC ID 107) A V T T D S W G K L Q (SEC ID - 108)
149	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGCCGCTTCAG (SEC ID 109) A V T T D S W G P L Q (SEC ID 110)
65	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGAAGATGCAG (SEC ID 111) A V T T D S W G K M Q (SEC ID 112)
66	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGAAGTTGCAT (SEC ID 113) A V T T D S W G K L H (SEC ID 114)
153	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGTAGCTTCAT (SEC ID 115) A V T T D S W G X L H (SEC ID 116)
71	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGGAGCTTCAT (SEC ID 117) A V T T D S W G E L H (SEC ID 118)
70	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGAGGCTGCAT (SEC ID 119) A V T T D S W G R L H (SEC ID 120)
121	GCCGTTACAACCTGACAGCTGGGGGCAGCTTCAT (SEC ID 121) A V T T D S W G Q L H (SEC ID 122)

ES 2 327 229 T3

117	GCCGTTACAACTGACAGCTGGGGGAAGGTTTCAT- (SEC ID 123) A V T T D S W G K V H (SEC ID 124)
72	GCCGTTACAACTGACAGCTGGGGGAAGGTGAAT (SEC ID 125) A V T T D S W G K V N (SEC ED 126)
150	GCCGTTACAACTGACAGCTGGGGGAAGCTTCTG (SEC ID 127) A V T T D S W G K L L (SEC ID 128)

Ejemplo 9

15 *Producción de TCR A6 heterodimérico soluble con puente disulfuro no nativo entre las regiones constantes que contienen mutaciones en CDR3*

El ADN del fagemido que codifica los mutantes de TCR A6 de alta afinidad identificados en el ejemplo 6 se aisló de las células de *E. coli* relevantes usando un kit Mini-Prep (Quiagen, Reino Unido).

20 Para amplificar las secuencias de ADN de las cadenas α y β del TCR se usa amplificación por PCR usando el ADN del fagemido como diana y los siguientes cebadores.

25 Para amplificar las secuencias de ADN de las cadenas α y β del TCR se usa amplificación por PCR usando el ADN del fagemido como diana y los siguientes cebadores.

Cebador directo para la cadena alfa del TCR A6

30 ggaattc atcgatg cagaaggaagtggagcag (SEC ID 129)

(El sitio de restricción ClaI está subrayado)

35 Cebador inverso de la cadena alfa del TCR universal

gtacacggcccggcgggttctgatatac (SEC ID 130)

(El sitio de restricción EagI está subrayado)

Cebador directo para la cadena beta de A6

45 Tctctcattaatgaatgctggtgtcactcagacccc (SEC ID 131)

(El sitio de restricción AseI está subrayado)

Cebador inverso de la cadena beta universal

50 Tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc (SEC ID 132)

(El sitio de restricción AgeI está subrayado)

55 En el caso de la cadena β del TCR se llevó a cabo otro punto de PCR para reemplazar el codón de terminación ámbar en la región CDR3 con un codón codificador de ácido glutámico. Cuando se suprime un codón de terminación ámbar se suprime en *E. coli*, normalmente se introduce un residuo de glutamina en lugar de detenerse la traducción. Por tanto, cuando el TCR que contiene el codón ámbar se presenta en la superficie del fago, contiene un residuo de glutamina en esta posición. No obstante, cuando el gen de la cadena β del TCR se transfirió al plásmido de expresión, se usó un residuo de ácido glutámico como alternativa a la glutamina. Los cebadores usadas para estos puntos de PCR fueron los siguientes:

65 YOL124 CTGCTCTGGTTCCGCACTC (SEC ID 133)

YOL125 GAGTGCGGAACCAGAGCAG (SEC ID 134)

La secuencia de ADN de la cadena β del TCR A6 soluble mutada se verificó mediante secuenciación automática (véase la figura 14 a para la secuencia de ADN de la cadena β del TCR A6 mutado y 14b para la secuencia de aminoácidos codificada). La figura 14c muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena β del TCR A6 sin sustitución de glutamina en ácido glutámico, es decir, la secuencia que estaba presente en el clon 134 se aísla mediante ELISA del fago.

A continuación, estas secuencias de ADN de α y β del TCR A6 se usaron para producir un TCR A6 soluble tal y como se describe en el documento WO 03/020763. Brevemente, las dos cadenas se expresan como cuerpos de inclusión en cultivos de *E. coli* distintos. Después, los cuerpos de inclusión se aíslan, desnaturalizan y vuelven a plegar juntos *in vitro*.

Ejemplo 10

15 *Caracterización mediante plasmón superficial BIAcore de una unión de alta afinidad del TCR A6 a HLA-A2 Tax*

Para analizar la unión del clon de alta afinidad 134 del TCR A6 (véanse las firmas 15a y 15b de las secuencias completas de ADN y de aminoácidos de la cadena β del TCR mutado, respectivamente) al ligando HLA-A2 se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (BIAcore 3000™). Esto se facilitó produciendo complejos de pMHC (que se describen más adelante) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de un modo semiorientado, lo que permite un análisis eficiente de la unión de un receptor soluble de células T con hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en diferentes células de flujo) de forma simultánea. La inyección manual del complejo HLA permite el nivel preciso de moléculas de clase I inmovilizadas para su fácil manipulación.

Los complejos biotinilados de HLA de clase I-A2 se volvieron a plegar *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión expresados en bacterias, que contienen las subunidades proteicas constituyentes y el péptido sintético, seguido por purificación y biotilación *in vitro* (O'Callaghan y col. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). La cadena pesada del HLS se expresó con un indicador de biotilación en el extremo C, que sustituye a los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en un constructo adecuado. Se obtuvieron niveles de expresión del cuerpo de inclusión de 75 mg/litro de cultivo bacteriano. La cadena ligera del HLA o β 2-microglobulina también se expresó en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de un constructo adecuado, a un nivel de 500 mg/litro de cultivo bacteriano.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purificaron hasta una pureza de aproximadamente un 80%. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturalizó en guanidina-HCl 6M, Tris 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, y se volvió a plegar a una concentración de 30 mg/litro la cadena pesada, 30 mg/litro la β 2m en L-Arginina-HCl 0,4M, Tris mM a pH 8,1, cistamina 3,7 mM, cisteamina mM, 4 mg/ml de péptido (p. ej., tax 11-19) mediante la adición de un único pulso de proteína desnaturalizada en tampón de replegamiento a <5°C. Se dejó que el replegamiento alcanzara el final a 4°C durante al menos 1 hora.

El tampón se intercambió mediante diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM a pH 8,1.

Fueron necesarios dos cambios de tampón para reducir lo suficiente la fuerza iónica de la solución. A continuación se filtró la solución proteica a través de un filtro de acetato de celulosa de 1,5 μ m y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ (8 ml de volumen de lecho). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM. El complejo HLA-A2-péptido eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM y se recogieron las fracciones de los picos, se añadió un cóctel de inhibidores de la proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Se cambió el tampón de los complejos HLA-A2 marcados con biotilación a Tris 10 mM a pH de 8,1, NaCl 5 mM usando una columna de desalación rápida de Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteína se enfriaron en hielo y se añadió el cóctel de inhibidor de la proteasa (Calbiochem). Después se añadieron los reactivos de biotilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado hasta un pH de 8), MgCl₂ 7,5 mM y enzima BirA 5 mg/ml (purificado de acuerdo con O'Callaghan y col. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Después se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche.

Los complejos HLA-A2 biotinilados se purificaron usando cromatografía de filtración en gel. Una columna Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 se pre-equilibró con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción de biotilación y la columna se desarrolló con PBS a 0,5 ml/min. Los complejos HLA-A2 biotinilados eluyeron en forma de un único pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se agruparon, enfriaron en hielo y se añadió el cóctel de inhibidor de la proteasa. La concentración de proteína se determinó usando un ensayo de unión con Coomassie (PerBio) y alícuotas de complejos HLA-A2 biotinilados se almacenaron congelados a -20°C. La estreptavidina se inmovilizó mediante procedimientos estándar de acoplamiento de amina.

Las interacciones entre el TCR A6 Tax de alta afinidad que contiene un enlace entre cadenas nuevo y el complejo HLA-A2 Tax o una combinación irrelevante de HLA-A2 NY-ESO, cuya producción se ha descrito en lo que antecede, se analizaron en un biosensor de resonancia en plasmón superficial (RPS) BIAcore3000™. La RPS mide los cambios

ES 2 327 229 T3

del índice de refracción expresados en unidades de respuesta (UR) cerca de la superficie de un sensor dentro de una célula de flujo pequeña, un principio que se puede usar para detectar interacciones entre receptor y ligando y para analizar sus parámetros de afinidad y cinéticos. Las células de flujo sonda se prepararon mediante inmovilización de los complejos peptídicos HLA-A2 individuales en células de flujo aparte mediante la unión entre la biotina reticulada en β 2m y estreptavidina que han sido reticuladas químicamente con la superficie activada de las células de flujo. Después se realizó el ensayo pasado el sTCR sobre las superficies de diferentes células de flujo a un caudal constante y midiendo la respuesta en RPS al hacerlo. Inicialmente, la especificidad de la interacción se verificó pasando el TCR A6 soluble a un caudal constante de $5 \mu\text{l min}^{-1}$ sobre cuatro superficies diferentes; una recubierta con ~ 1000 RU del complejo HLA-A2 Tax, la segunda recubierta con ~ 1000 RU del complejo HLA-A2 NY-ESO y dos células de flujo en blanco recubiertas sólo con estreptavidina (véase la figura 15).

La mayor afinidad del TCR A6 soluble mutado dificultó el cálculo de la k_d para la interacción de este resto con el complejo HLA-A2 Tax. No obstante, se calculó una semivida ($t_{1/2}$) para la interacción de 51,6 minutos (véase la figura 6), que se compara con una $t_{1/2}$ para la interacción de tipo salvaje de 7,2 segundos.

Ejemplo 11

Producción del vector que codifica un TCR soluble de NY-ESO TCR que contiene un puente disulfuro nuevo

La cadena β del TCR A6 soluble preparado en el Ejemplo 1 contiene en la secuencia nativa un sitio de restricción BgIII (AAGCTT) adecuado para usar como sitio de unión.

La mutagénesis por PCR se llevó a cabo como se detalla más adelante para introducir un sitio de restricción BamHI (GGATCC) en la cadena α del TCR A6 soluble, extremo 5' del nuevo codón de cisteína. La secuencia descrita en la Figura 2a se usó como molde para esta mutagénesis. Se usaron los cebadores siguientes:

| BamHI |

5' -ATATCCAGAACCCgGA ϵ CCCTGCCGTGTA-3 (SEC ID 135)

5'-TACACGGCAGGAaTCCGGGTTCTGGATAT-3' (SEC ID 136)

Se mezclaron 100 ng de plásmido con $5 \mu\text{l}$ de dNTP 10 mM, $25 \mu\text{l}$ de 10x tampón Pfu (Stratagene), 10 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene) y el volumen final se ajustó hasta $240 \mu\text{l}$ con H_2O . 48 ml de esta mezcla se suplementaron con cebadores diluidos para dar una concentración final de $0,2 \mu\text{M}$ en un volumen de reacción final de $50 \mu\text{l}$. Tras una etapa de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95°C , la mezcla de reacción se sometió a 15 ciclos de desnaturalización (95°C , 30 s), renaturalización (55°C , 60 s) y elongación (73°C , 8 min) en una máquina de PCR Hybaid PCR express. A continuación el producto se digirió durante 5 horas a 37°C con 10 unidades de la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs). 10 ml de la reacción digerida se transformaron en bacterias XL1-Blue competentes y se cultivaron durante 18 horas a 37°C . Se escogió una única colonia y se cultivó durante la noche en 5 ml de TYP + ampicilina (16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 2,5 g/l de K_2HPO_4 , 100 mg/l de ampicilina). El ADN plasmídico se purificó en columna mini-prep Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la secuencia se verificó mediante secuenciación automática en el centro de secuenciación del Departamento de Bioquímica, Universidad de Oxford. El ADNc que codifica el TCR de NY-ESO se aisló de las células T según técnicas conocidas. El ADNc que codifica el TCR de NY-ESO se produjo mediante tratamiento del ARNm con transcriptasa inversa.

Con el fin de producir vectores que codifiquen un TCR soluble de NY-ESO que incorpore un puente disulfuro nuevo se usaron como moldes los plásmidos con TCR. A6 que contienen los sitios de restricción BamHI de la cadena α y BgIII de la cadena β . Se usaron los cebadores siguientes:

| NdeI |

5' -GGAGATATACATATGCAGGAGGTGACACAG -3' (SEC ID 137)

5' -TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT-3' (SEC ID 138)

| BamHI |

|NdeI |

5' -GGAGATATACATATGGGTGTCACCTCAGACC-3' (SEC ID 139)

5' -CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC -3' (SEC ID 140)

|BglII|

Los constructos de cadena α y β del TCR de NY-ESO se obtuvieron mediante clonación por PCR del siguiente modo. Las reacciones de PCR se realizaron usando los cebadores tal como se ha mostrado en lo que antecede y los moldes que contienen las cadenas nativas del TCR de NY-ESO. Los productos de la PCR se digirieron con enzimas de restricción con las enzimas de restricción relevantes y se clonaron en pGMT7 para obtener plásmidos de expresión. La secuencia de los insertos plasmídicos se confirmó mediante secuenciación del ADN. Las figuras 17a y 17b muestran la secuencia de ADN de las cadenas α y β , respectivamente, del TCR de NY-ESO mutado y las figuras 18^a y 18^b muestran las secuencias de aminoácidos resultantes.

Ejemplo 12

Construcción de vectores de presentación en fago y clonación de ADN que codifica las cadenas α y β del TCR de NY-ESO en los vectores fagemido

El ADN que codifica las cadenas α y β del TCR de NY-ESO que incorpore nuevos codones de cisteína para facilitar la formación de un puente disulfuro no nativo entre cadenas producido como se ha descrito en el ejemplo 11 se incorporó en el vector fagemido pEX746 del siguiente modo.

Los ADN que codifica las dos cadenas del TCR de NY-ESO se sometieron individualmente a PCR con el fin de introducir sitios de clonación compatibles con el vector fagemido pEX746 (que contiene ADN que codifica el clon 7 del TCR A6) usando los cebadores siguientes:

Para la cadena alfa del TCR de NY-ESO

TRAV21

GCCGGCCATGGCCAAACAGGAGGTGACGCAGATTCCT (SEC ID 141)

YOL6

CTTCTTAAAGAATTCTTAATTAACCTAGGTTATTAGGAACTTTCTGGGCTG
GGGAAG (SEC ID 142)

Para la cadena beta del TCR de NY-ESO

TRBV6-1/2/3/5/6/7/8/9

TCACAGCGCGCAGGCTGGTGTCACTCAGACCCCAA (SEC ID 143)

RT1 CGAGAGCCCGTAGAACTGGACTTG (SEC ID 144)

Los procedimientos de clonación molecular para construir los vectores se describe en "Molecular cloning: A laboratory manual, by J. Sambrook y D. W. Russell". Los cebadores enumerados en la tabla 1 se usan para la construcción de los vectores. Un ejemplo del programa de la PCR es 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 53°C durante 5 segundos y 72°C durante 90 segundos, seguido por 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos, y después mantener a 4°C. La ADN polimerasa Expand hifidelity Taq se adquiere en Roche. El ADN que codifica el clon 7 de la cadena β del TCR A6 se eliminó del pEX746 mediante digestión con las enzimas de restricción BssHII y BglII. El ADN digerido mediante PCR de forma correspondiente que codifica la cadena β del NY-ESO se sustituyó después en el fagemido mediante ligado. La secuencia del producto de clonación se verificó mediante secuenciación automática.

De igual forma, el ADN que codifica el clon 7 de la cadena α del TCR A6 se eliminó del pEX746 mediante digestión con las enzimas de restricción NcoI y AvrII. El ADN digerido mediante PCR de forma correspondiente que codifica la cadena α del NY-ESO se sustituyó después en el fagemido que ya contenía el ADN codificador de la cadena β del TCR de NY-ESO mediante ligado. La secuencia del producto de clonación se verificó mediante secuenciación

ES 2 327 229 T3

automática. Las figuras 19a y 19b detallan, respectivamente, la secuencia de ADN y de aminoácidos de las cadenas α y β del TCR de NY-ESO, así como la secuencia relevante adyacente incorporada en el fagemido (pEX746:NY-ESO). La secuencia precedente al sitio NcoI es la misma que en pEX746.

5 Ejemplo 13

Expresión de fusiones de la proteína de la cubierta bacteriana y el TCR de NY-ESO heterodimérico en E. coli

10 Las partículas de fago que presentan el TCR de NY-ESO heterodimérico que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas se prepararon usando procedimientos descritos anteriormente para la generación de partículas de fago que presentan scFvs de anticuerpo (Li y col., 2000, Journal of Immunological Methods 236: 133-146) con las modificaciones siguientes. Se usaron células *E. coli* TG1 que contienen fagemido pEX746:NY-ESO (es decir, el fagemido que codifica la cadena α del TCR de NY-ESO soluble y una cadena β d el TCR de NY-ESO fusionada con la proteína gIII del fago producida como se ha descrito en el Ejemplo 12) se usaron para inocular 10 ml de 2xTY (que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa) y, después, el cultivo se incubó con agitación a 37°C durante la noche (16 horas). 50 μ l del cultivo durante la noche se usó para inocular 10 ml de 2xTY (que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa) y, después, el cultivo se incubó con agitación a 37°C hasta una DO_{600nm} = 0,8. Al cultivo se añadió el fago colaborador HYPERPHAGE hasta la concentración final de 5×10^9 ufp/ml. A continuación, el cultivo se incubó a 37°C sin variar durante treinta minutos y, después, con agitación a 200 rpm durante otros 30 minutos. El medio del cultivo anterior se pasó a 50 ml con 2xTY (que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 25 mg/ml de kanamicina), después el cultivo se incubó a 25°C con agitación a 250 rpm durante 36 horas a 48 horas. Después, el cultivo se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se almacenó a 4°C para su posterior concentración. Después, el sobrenadante se concentró mediante precipitación en PEG y se resuspendió en PBS al 10% del volumen original almacenado.

Ejemplo 14

30 *Detección de TCR de NY-ESO heterodimérico funcional que contiene un puente disulfuro no nativo entre cadenas sobre las partículas de fago filamentosos*

La presencia de TCR de NY-ESO funcional (unión HLA-A2-NY-ESO) presentado sobre las partículas de fago en la suspensión concentrada preparada en el Ejemplo 13 se detectó usando los métodos de ELISA para fagos descritos en el Ejemplo 4. La figura 20 muestra la unión específica de las partículas de fago que presentan el TCR de NY-ESO a HLA-A2-NY-ESO en un ensayo ELISA para fagos.

Ejemplo 15

40 *Construcción de plásmidos para la expresión celular de los genes HLA-DRA*

Las secuencias de ADN que codifican la porción extracelular de las cadenas de HLA-DRA se amplifican a partir del ADNc aislado de la sangre de un sujeto humano sano, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los pares de cebadores sintéticos para ADN que se han diseñado de modo que incluyan un sitio de restricción Bgl II.

A continuación se usa la mutagénesis por PCR para añadir ADN que codifica la cremallera de Fos leucina en el extremo 3' de la secuencia amplificada.

50 Las manipulaciones y clonación de ADN descritas en lo que antecede se llevan a cabo tal y como se ha descrito en Sambrook, J y col.; (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU.

La figura 21 proporciona la secuencia de ADN de la cadena β de HLA-DR lista para su inserción en el vector de expresión bicistrónico. Esta figura indica la posición de los codones que codifican el péptido cremallera Fos leucina y el marcador de biotilación.

La numeración de los aminoácidos se basa en la secuencia de ratón Kabat, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Dept of Health & Human Services, Public Health Service, NIH, Bethesda, MD 1-1137).

Esta secuencia de ADN se inserta después en un vector baculovirus bicistrónico pAcAB3 (véase la Figura 22 para la secuencia de este vector) junto con ADN que codifica la correspondiente cadena β de HLA de clase II para la expresión en células Sf9 de insecto. Este vector se puede usar para expresar cualquier complejo péptido-HLA de clase II en células de insecto.

ES 2 327 229 T3

Ejemplo 16

Construcción de plásmidos para la expresión celular de los genes HLA-DRB de tipo salvaje y mutantes

5 Las secuencias de ADN que codifican la porción extracelular de las cadenas de HLA-DRB se amplifican a partir del ADNc aislado de la sangre de un sujeto humano sano, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los pares de cebadores sintéticos para ADN que se han diseñado de modo que incluyan un sitio de restricción BamHI.

10 A continuación se usa la mutagénesis por PCR para añadir ADN que codifica la cremallera de Jun leucina en el extremo 3' de la secuencia amplificada y el ADN que codifica el péptido Flu HA cargado por la molécula HLA-DR1 en el extremo 5' de la secuencia.

15 Las manipulaciones y clonación de ADN descritas en lo que antecede se llevan a cabo tal y como se ha descrito en Sambrook, J y col.; (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU.

20 La figura 23 proporciona la secuencia de ADN de la cadena β de HLA-DR lista para su inserción en el vector de expresión bicistrónico. Esta figura indica la posición de los codones que codifican la cremallera Jun leucina y el péptido Flu Ha.

La numeración de los aminoácidos se basa en la secuencia de ratón Kabat, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Dept of Health & Human Services, Public Health Service, NIH, Bethesda, MD 1-1137).

25 Esta secuencia de ADN se inserta después en un vector baculovirus bicistrónico pAcAB3 (véase la Figura 22 para la secuencia de este vector) junto con ADN que codifica la correspondiente cadena α de HLA de clase II para la expresión en células Sf9 de insecto. Este vector se puede usar para expresar cualquier complejo péptido-HLA de clase II en células de insecto.

30 Ejemplo 17

Expresión y replegamiento de los complejos HLA de clase II-DR1-Flu HA

35 La expresión de MHC de clase II se lleva a cabo usando los vectores de expresión bicistrónicos producidos como se ha descrito en los ejemplos 15 y 16, que contienen las cadenas α y β de HLA-DR1 de clase II y el péptido Flu HA. Los procedimientos de expresión y purificación usados son como se describe en Gauthier (1998) PNAS USA 95 p1 1828-118333). Brevemente, el HLADR1 soluble se expresa en el sistema de baculovirus reemplazando las regiones transmembrana hidrofóbicas y los segmentos citoplasmáticos de las cadenas α y β de DR con los dominios de dimerización de la cremallera de leucina de los factores de transcripción Fos y Jun.

40 En el constructo de expresión, la secuencia peptídica de Flu HA cargada con MHC de clase está covalentemente unida al extremo N de la cadena β del Dr. maduro y la cadena α de DR contiene una secuencia indicadora de biotilación para facilitar la formación de ligando bifuncional utilizando la metodología de multimerización con biotina/estreptavidina. La proteína recombinante es secretada por las células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante y se purifica mediante cromatografía de afinidad. La proteína se purifica más mediante HPLC de intercambio aniónico.

50 Ejemplo 18

Construcción de moléculas de HLA-péptido soluble de clase I

55 Con el fin de investigar más la especificidad del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad se produjeron las siguientes moléculas de HLA-péptido de clase I solubles.

HLA-A2 - péptido (LLGRNSFEV) (SEC ID 23)

60 HLA-A2 - péptido (KLVALGINAV) (SEC ID 24)

HLA-A2 - péptido (LLGDLFGV) (SEC ID 25)

65 HLA-B8 - péptido (FLRGRAYGL) (SEC ID 26)

HLA-B27 - péptido (HRCQAIRKK) (SEC ID 27)

ES 2 327 229 T3

HLA-Cw6 - péptido (YRSGIIAVV) (SEC ID 28)

HLA-A24 - péptido (VYGFVRACL) (SEC ID 29)

5 HLA-A2 - péptido (ILAKFLHWL) (SEC ID 30)

HLA-A2 - péptido (LTLGEFLKL) (SEC ID 31)

10 HLA-A2 - péptido (GILGFVFTL) (SEC ID 33)

HLA-A2 - péptido (SLYNTVATL) (SEC ID 34)

15 Estos péptido-HLA solubles se produjeron usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 10.

Ejemplo 19

20 *Medición mediante resonancia de plasmón superficial BIAcore de la especificada de la unión del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad con e péptido-HLA*

25 Para analizar la especificidad de unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (BIAcore 3000™). (Véanse las Figuras 15a & 15b para las secuencias completas de ADN y de aminoácidos de la cadena β del TCR mutado). Esto se llevó a cabo usando el péptido HLA de clase II-DR1 producido como se describe en los Ejemplos 15-17 y los complejos péptido de Clase I-HLA enumerados en el ejemplo 18, producido usando los procedimientos detallados en el ejemplo 10. La tabla siguiente enumera los complejos péptido-HLA utilizados:

30 1. HLA-A2 - péptido (LLGRNSFEV) (SEC ID 23)

2. HLA-A2 - péptido (KLVALGINAV) (SEC ID 24)

35 3. HLA-A2 - péptido (LLGDLFGV) (SEC ID 25)

4. HLA-B8 - péptido (FLRGRAYGL) (SEC ID 26)

40 5. HLA-B27 - péptido (HRCQAIRKK) (SEC ID 27)

6. HLA-Cw6 - péptido (YRSGIIAVV) (SEC ID 28)

45 7. HLA-A24 - péptido (VYGFVRACL) (SEC ID 29)

8. HLA-A2 - péptido (ILAKFLHWL) (SEC ID 30)

50 9. HLA-A2 - péptido (LTLGEFLKL) (SEC ID 31)

10. HLA-DR - péptido (PKYVKQNTLKLA) (SEC ID 32)

55 11. HLA-A2 - péptido (GILGFVFTL) (SEC ID 33)

12. HLA-A2 - péptido (SLYNTVATL) (SEC ID 34)

60 Los HLA péptido anteriores se inmovilizaron en superficies de unión recubiertas con estreptavidina de las células de flujo de un BIAcore 3000™ de un modo semi-orientado.

65 El BIAcore 3000™ permite el análisis de la unión del receptor soluble de células T a hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en células de flujo diferentes) de forma simultánea. Para este experimento se inmovilizaron tres HLA-péptidos diferentes en las células de flujo 2-4 y la célula de flujo 1 se dejó en blanco como control. La inyección manual de los complejos HLA-péptido permitió el nivel preciso de moléculas inmovilizadas para su manipulación.

ES 2 327 229 T3

Después de evaluar la capacidad del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad de unión a los primeros 3 complejos HLA-péptido de la lista anterior, los siguientes tres se inmovilizaron sobre estas células de flujo directamente en la parte superior de los previos. Este procedimiento continuó hasta que se hubo evaluado la unión del clon 134 del tCR A6 de alta afinidad a los 12 complejos HLA-péptido.

Diez inyecciones de 5 μ l del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad se pasaron sobre cada célula de flujo a 5 μ l/min a concentraciones variables de 4,1 ng/ml a 2,1 mg/ml. (Véanse las figuras 24-28). Como control final, el clon 134 del TCR A6 de alta afinidad se pasó sobre una célula de flujo que contiene HLA-A2 Tax inmovilizado (LLFGYPVYV) (SEC ID 21), el ligando conocido de este TCR.

La unión específica del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad sólo se observó con su ligando conocido. (HLA-A2 Tax (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21)) Estos datos demuestran además la especificidad del clon 134 del TCR A6 de alta afinidad. (Véanse las figuras 24-).

Ejemplo 20

Mutagénesis de las regiones CDR3 del TCR de NY-ESO

Las regiones CDR3 del TCR de NY-ESO eran la diana para la introducción de mutaciones para investigar la posibilidad de generar mutantes de alta afinidad. Esto se consiguió usando cebadores de PCR específicos del TCR de NY-ESO en combinación con procedimientos sustancialmente iguales a los detallados en el ejemplo 7.

Ejemplo 21

Aislamiento de mutantes de TCR A6 de alta afinidad

El aislamiento de mutantes de TCR de NY-ESO de alta afinidad se llevó a cabo usando el primero de los dos procedimientos descritos en el ejemplo 8.

Se identificó un único mutante del TCR de NY-ESO de alta afinidad.

Ejemplo 22

Producción de TCR de NY-ESO heterodimérico soluble de alta afinidad con puente disulfuro no nativo entre las regiones constantes que contienen mutaciones en la región variable

El ADN del fagemido que codifica los mutantes de TCR de NY-ESO de alta afinidad identificados en el ejemplo 21 se aisló de las células de *E. coli* relevantes usando un kit Mini-Prep (Quiagen, Reino Unido).

Para amplificar la secuencia de ADN de la región variable de la cadena β del TCR de NY-ESO soluble mutada se usó amplificación por PCR usando el ADN del fagemido como diana y los siguientes cebadores.

Cebador directo de la cadena beta de NY-ESO

Tctctcattaatgaatgctgtgtcactcagacccc (SEC ID 145)

(El sitio de restricción AseI está subrayado)

Cebador inverso de la cadena beta universal

Tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtgg (SEC ID 146)

(El sitio de restricción AgeI está subrayado)

El producto de la PCR se digirió con AgeI/AseI y se clonó en pEX821 (producido como se ha descrito en el ejemplo 11) cortado con NdeI/AgeI.

La secuencia de ADN de la cadena β del TCR de NY-ESO mutado amplificada como se ha descrito en lo que antecede y la cadena α del TCR de NY-ESO producida como se ha descrito en el ejemplo 11 se usaron después para producir un TCR de NY-ESO de alta afinidad soluble como se describe en el documento WO 03/020763. Brevemente, las dos cadenas se expresan como cuerpos de inclusión en distintos cultivos de *E. coli*. Después, los cuerpos de inclusión se aíslan, desnaturalizan y vuelven a plegar juntos *in vitro*.

ES 2 327 229 T3

Ejemplo 23

Caracterización mediante plasmón superficial BIAcore de una unión de alta afinidad del TCR de NY-ESO a HLA-A2 NY-ESO

5 Para analizar la unión del TCR de NY-ESO de alta afinidad al ligando HLA-A2 NY-ESO se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (Biacore 3000™). Esto se facilitó produciendo complejos de pMHC (como se describe en el ejemplo 10) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de un modo semiorientado, lo que permite un análisis eficiente de la unión de un receptor soluble de células T con hasta cuatro
10 pMHC diferentes (inmovilizados en diferentes células de flujo) de forma simultánea.

La inyección manual del complejo HLA permite el nivel preciso de moléculas de clase I inmovilizadas para su fácil manipulación.

15 Las interacciones entre el TCR de NY-ESO de alta afinidad que contiene un nuevo enlace entre cadenas y el complejo HLA-A2 NY-ESO o una combinación irrelevante de HLA-A2 Tax, cuya producción se describe en el ejemplo 10, se analizaron en un biosensor de resonancia en plasmón superficial (RPS) Biacore 3000™, de nuevo como se describe en el ejemplo 10.

20 Se calculó que la kd de la interacción del NY-ESO soluble de alta afinidad con HLA-A2 NY-ESO era de 4,1 μm (véanse las figuras 29a y 29b), que se compara con una kd de 15,7 μm para la interacción de tipo salvaje. (Véanse las figuras 30a y 30b).

25 Ejemplo 24

Producción y análisis de otros TCR A6 de alta afinidad

30 Usando los procedimientos detallados en el ejemplo 9 se produjeron TCR solubles que contienen las mutaciones siguientes correspondientes a las identificadas en los clones 89, 1, 111 y 71 (véase el ejemplo 8). La unión de estos TCR solubles a HLAA2 Tax se evaluó después usando el ensayo Biacore detallado en el Ejemplo 10.

Mutantes de la cadena β de TCR A6

35

Clon	Secuencia CDR3
40 Tipo salvaje	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEC ID 83) A S R P G L A G G R P E Q Y (SEC ID 84)
45 89	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGATTAG (SEQ ID 91) A S R P G L A G G R P E D X (SEC ID 92)
50 1	GCCTCGAGGCCGGGGCTGGTTCCGGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEC ID 97) A S R P G L V P G R P E Q X (SEC ID 98)
55 111	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCACATCCGTAG (SEC ID 101) A S R P G L A G G R P H P X (SEC ID 102)
60	

65

ES 2 327 229 T3

Mutantes de la cadena α de TCR A6

Clon	CDR3
Tipo salvaje	GCCGTTACA ACTGACAGCTGGGGGAAGCTTCAG (SEC ID 107) A V T T D S W G K L Q (SEC ID 108)
71	GCCGTTACA ACTGACAGCTGGGGGGAGCTTCAT (SEC ID 117) A V T T D S W G E L H (SEC ID 118)

Mutaciones combinadas usadas como base para la producción de TCR A6 solubles mutados

Mutaciones del clon 89 + mutaciones del clon 134

Mutaciones del clon 71 + mutaciones del clon 134

Mutaciones del clon 71 + mutaciones del clon 89

Mutaciones del clon 1 + mutación β G102→A

Resultados

La tabla siguiente compara la afinidad por HLA-A2 Tax de los TCR A6 solubles mutados anteriores con la obtenida usando un TCR A6 soluble que contiene regiones variables no mutadas. Obsérvese que la afinidad de los mutantes de mayor afinidad se expresa como la semivida para la interacción. ($T_{1/2}$) Estos TCR A6 solubles mutados exhibieron mayor afinidad por HLA-A2 Tax que el TCR A6 soluble no mutado como queda demostrado por su menor k_d o mayor $T_{1/2}$ para la interacción.

Las figuras 31-37 muestran las trazas Biacore usadas para calcular la afinidad por HLA-A2 Tax de estos TCR solubles mutados. Las figuras 38a-e muestran la secuencia de aminoácidos de las cadenas del TCR A6 mutado.

TCR A6	Kd (μ M)	$T_{1/2}$ (s)
Tipo salvaje	1,9	7
Clon 1		810
Clon 89	0,41	
Clon 111	1,18	
Clon 71	1,37	
Mutaciones Clon 89 + clon 134		114 (fase 1) 4500 (fase 2)
Mutaciones Clon 71 + clon 134		882
Mutaciones Clon 71 + clon 89	0,35	
Mutación Clon 1 + mutación β G102→A		738

ES 2 327 229 T3

Ejemplo 25

Tinción celular usando tetrámeros y monómeros de TCR A6 de alta afinidad

5 Las células presentadoras de antígeno T2 se incubaron con $\beta 2m$ ($3 \mu g/ml$) pulsado con péptido Tax a un intervalo de concentraciones (10^{-5} - $10^{-9}M$) durante 90 minutos a $37^{\circ}C$. Los controles, también usando células T2 incubadas con $\beta 2m$ ($3 \mu g/ml$) se pulsaron con péptido Flu $10^{-5}M$ o se incubaron sin péptido (sin pulsar).

10 Después de pulsar, las células se lavaron en RPMI sin suero y 2×10^5 células se incubaron con el clon 134 del TCR A6 tetramérico de alta afinidad unido a estreptavidina marcado con ficoeritrina (PE). Molecular probes, Países Bajos) ($10 \mu g/ml$) o clon 134 de monómeros de TCR A6 de alta afinidad marcados con Alexa 488 (Molecular probes, Países Bajos) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células, la unión de los tetrámeros y los monómeros de TCR marcados se analizó mediante citometría de flujo usando un FACSVantage SE (Becton Dickinson).

15

Resultados

20 Como se ilustra en la Figura 39a, se podía observar la tinción específica de las células T2 por los tetrámeros de TCR A6 de alta afinidad a las concentraciones del péptido Tax inferiores a $10^{-9}M$.

Como se ilustra en la Figura 39b, se podía observar la tinción específica de las células T2 por los monómeros de TCR A6 de alta afinidad a las concentraciones del péptido Tax inferiores a $10^{-8}M$.

25

Organización solicitante

Calle: 57C Milton Park

30

Ciudad: Abingdon

Estado: Oxfordshire

35

País: Inglaterra

Código postal: OX14 4RX

Número de teléfono: +44 1235 438600

40

Número de fax: +44 1235 438601

Dirección de email: martin.green@avidex.com

45

<110> Nombre de la organización: Avidex Ltd

Solicitante individual

Calle: Avidex Ltd, 57C Milton Park

50

Ciudad: Abingdon

Estado: Oxfordshire

55

País: Inglaterra

Código postal: OX14 4RX

Número de teléfono: +44 1235 438600

60

Número de fax: +44 1235 438601

Dirección de email: bent.jakobsen@avidex.com

65

<110> Apellido: Jakobsen

<110> Nombre: Bent

<110> Inicial del segundo nombre: K

<110> Título: Dr.

5

Solicitante individual

Calle: Avidex Ltd, 57C Milton Park

10

Ciudad: Abingdon

Estado: Oxfordshire

15

País: Inglaterra

Código postal: OX14 4RX

Número de teléfono: +44 1235 438600

20

Número de fax: +44 1235 438601

Dirección de email: torben.andersen@avidex.com

<110> Apellido: Andersen

25

<110> Nombre: Torben

<110> Inicial del segundo nombre: B

30

<110> Título: Dr.

Solicitante individual

35

Calle: Avidex Ltd, 57C Milton Park

Ciudad: Abingdon

Estado: Oxfordshire

40

País: Inglaterra

Código postal: OX14 4RX

45

Número de teléfono: +44 1235 438600

Número de fax: +44 1235 438601

Dirección de email: peter.molloy@avidex.com

50

<110> Apellido: Molloy

<110> Nombre: Peter

55

<110> Inicial del segundo nombre: E

<110> Título: Dr.

60

Solicitante individual

Calle: Avidex Ltd, 57C Milton Park

Ciudad: Abingdon

65

Estado: Oxfordshire

País: Inglaterra

ES 2 327 229 T3

Código postal: OX14 4RX

Número de teléfono: +44 1235 438600

5 Número de fax: +44 1235 438601

Dirección de email: jonathan.boulter@avidex.com

10 <110> Apellido: Boulter

<110> Nombre: Jonathan

<110> Inicial del segundo nombre: M

15 <110> Título: Dr

Solicitante individual

20 Calle: Avidex Ltd, 57C Milton Park

Ciudad: Abingdon

25 Estado: Oxfordshire

País: Inglaterra

Código postal: OX14 4RX

30 Número de teléfono: +44 1235 438600

Número de fax: +44 1235 438601

35 Dirección de email: yi.li@avidex.com

<110> Apellido: Li

<110> Nombre: Yi

40 <110> Inicial del segundo nombre:

<110> Título: Dr.

Proyecto de la solicitud

<120> Título: sustancias

50 <130> Referencia: Caso nº 19

<140> Número de aplicación anterior: GB 0226227.7

<141> Fecha actual de presentación: 2002-11-09

55

Solicitudes anteriores

<150> Número de solicitud previa: GB0226227.7

60 <151> Fecha de archivo previa: 2002-11-09

Solicitudes anteriores

65 <150> Número de solicitud previa: GB 0301814.0

<151> Fecha de archivo previa: 2003-01-25

ES 2 327 229 T3

Solicitudes anteriores

<150> Número de solicitud previa GB 0304067.2

5 <151> Fecha de archivo previa: 2003-02-22

Solicitudes anteriores

10 <150> Número de solicitud previa: GB 0311397.4

<151> Fecha de archivo previa: 2003-05-16

Solicitudes anteriores

<150> Número de solicitud previa: GB 0316356.5

20 <151> Fecha de archivo previa: 2003-07-11

Solicitudes anteriores

25 <150> Número de solicitud previa: documento US 60/436.323

<151> Fecha de archivo previa: 2003-04-16

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 DSDVYITDKT VLDMRSMDFK 20

<212> Tipo: PRT

40 <211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 1

Descripción de la secuencia:

45

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

50 <400> Hebra pre-secuencia:

QSKDSDVYIT DKTVLDMRSM 20

<212> Tipo: PRT

55

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 2

60 Descripción de la secuencia:

Secuencia

65 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK 20

5 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 3

10

Descripción de la secuencia:

Secuencia

15

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Presecuenciación:

20

DPAVYQLRDS KSSDKSVCLF 20

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 4

Descripción de la secuencia:

30

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

35

<400> Hebra pre-secuencia:

NGKEVHSGVS TDPQPLKEQP 20

<212> Tipo: PRT

40

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 5

45

Descripción de la secuencia:

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Presecuenciación:

ALNDSRYALS SRLRVSATFW 20

55

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 6

Descripción de la secuencia:

65

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

PPEVAVFEPS EAEISHTQKA 20

5 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 7

10

Descripción de la secuencia:

Secuencia

15

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20

KEVHSGVSTD PQPLKEQPAL 20

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 8

Descripción de la secuencia:

30

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

35

<400> Hebra pre-secuencia:

VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ 20

<212> Tipo: PRT

40

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 9

45

Descripción de la secuencia:

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

PYIQNPEPAV YQLKDPRSQD ŠTLCLFTDFD SQINVPKTME SGTFITDKTV LDMKAMDSKS 60

NGAIAWSNQT SFTCQDIFKE TNATYPSSDV P 91

60

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 91

Nombre de la secuencia: SEC ID 10

65

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

```
EDLRNVTTPK VSLFEPKAE ĪANKQKATLV CLARGFFPDH VELSWVNGR EVHSGVSTDP 60
10 QAYKESNYSY CLSSRLRVSA TFWHNP RNHF RCQVQFHGLS EEDKWPEGSP KPVTQNISAE 120
    AWGRAD 126
```

15 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 126

Nombre de la secuencia: SEC ID 11

20 Descripción de la secuencia:

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30 ESGTFITDKT VLDMKAMDSK 20

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

35 Nombre de la secuencia: SEC ID 12

Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45 <400> Hebra pre-secuencia:

KTMESGTFIT DKTVLDMKAM 20

<212> Tipo: PRT

50 <211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 13

55 Descripción de la secuencia:

Secuencia

60 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

YIQNPEPAVY QLKDPRSQDS 20

65 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

ES 2 327 229 T3

Nombre de la secuencia: SEC ID 14

Descripción de la secuencia:

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

AVYQLKDPRS QDSTLCLFTD 20

<212> Tipo: PRT

15

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 15

20

Descripción de la secuencia:

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

NGREVHSGVS TDPQAYKESN 20

30

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

35

Nombre de la secuencia: SEC ID 16

Descripción de la secuencia:

Secuencia

40 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

45

KESNYSYCLS SRLRVSATFW 20

<212> Tipo: PRT

50

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 17

Descripción de la secuencia:

55

Secuencia

60 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

PPKVSLFEPS KAEIANKQKA 20

65

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 18

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 REVHSGVSTD PQAYKESNYS 20

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 20

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 19

Descripción de la secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30 VTPPKVSLFE PSKAEIANKQ 20

<212> Tipo: PRT

35 <211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 20

Descripción de la secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

LLFGYPVYV 9

50 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 21

55

Descripción de la secuencia:

Secuencia

60

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65 SLLMITQC 8

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 8

Nombre de la secuencia: SEC ID 22

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

LLGRNSFEV 9

15 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 23

Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30 KLVALGINAV 10

<212> Tipo: PRT

35 <211> Longitud: 10

Nombre de la secuencia: SEC ID 24

Descripción de la secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45 <400> Hebra pre-secuencia:

LLGDLFGV 8

50 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 8

Nombre de la secuencia: SEC ID 25

55 Descripción de la secuencia:

Secuencia

60 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65 FLRGRAYGL 9

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 26

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 HRCQAIRKK 9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 27

Descripción de la secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30 YRSGIIAVV 9

<212> Tipo: PRT

35 <211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 28

Descripción de la secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

VYGFVRACL 9

50 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 29

55

Descripción de la secuencia:

Secuencia

60

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65 ILAKFLHWL 9

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 30

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

LTLGFLKLL 9

15

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

20

Nombre de la secuencia: SEC ID 31

Descripción de la secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30

PKYVKQNTLK LA 12

<212> Tipo: PRT

35

<211> Longitud: 12

Nombre de la secuencia: SEC ID 32

Descripción de la secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

GILGFVFTL 9

50

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia SEC ID 33

55

Descripción de la secuencia:

60 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65

SLYNTVATL 9

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 9

Nombre de la secuencia: SEC ID 34

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 cacagacaaa tgtgtgctag acat 24

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 24

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 35

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 35

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 atgtctagca cacattgtc tgtg 24

<212> Tipo: ADN

40 <211> Longitud: 24

Nombre de la secuencia: SEC ID 36

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 36

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

55

<400> Hebra pre-secuencia:

cagtggggtc tgcacagacc c 21

60 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 21

Nombre de la secuencia: SEC ID 37

65

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 37

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

gggtctgtgc agacccact g 21

<212> Tipo: ADN

15

<211> Longitud: 21

Nombre de la secuencia: SEC ID 38

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 38

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

taataatag tataataata ttctattca aggagacagt c 41

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 41

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 39

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 39

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

caatccagcg gctgccgtag gcaatagga ttcattatg actgtctct tgaaatag 58

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 58

Nombre de la secuencia: SEC ID 40

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 40

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc cag 53

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 53

Nombre de la secuencia: SEC ID 41

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 41

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gttctgctcc acttctctct gggccatggc cggctgggcc g 41

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 41

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 42

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 42

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

cagaaggaag tggagcagaa c 21

55

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 21

Nombre de la secuencia: SEC ID 43

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 43

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

cttcttaaag aattcttaat taacctaggt tattaggaac ttctgggct ggggaag 57

<212> Tipo: ADN

15

<211> Longitud: 57

Nombre de la secuencia: SEC ID 44

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 44

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gtaattaag aattcttaa gaaggagata tacatatgaa aaaattatta ttcgcaattc 60

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 60

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 45

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 45

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

cgcgctgta gaatagaag gaacaactaa aggaattgcg aataataatt tttcatatg 60

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 60

Nombre de la secuencia: SEC ID 46

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 46

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

ctttctattc tcacagcgcg caggctggtg tcaactcagac 40

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 40

Nombre de la secuencia: SEC ID 47

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 47

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

atgatgtcta gatgcggccg cgtctgctct accccaggcc tc 42

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 48

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 48

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

gcactagac atcatcacca tcactcactag actgttgaaa gttgttagc aaaac 55

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 55

Nombre de la secuencia: SEC ID 49

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 49

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

ctagaggga ccttattaag actccttatt acgcagtatg 40

<212> Tipo: ADN

15

<211> Longitud: 40

Nombre de la secuencia: SEC ID 50

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 50

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 **agctgcagct aatacgactc actataggaa caggccacca tggcgtcgat tatgctgagt 60**

gatatccttg tccggtggta ccctag 86

40 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 86

Nombre de la secuencia: SEC ID 51

45

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

50 Nombre de la secuencia: SEC ID 51

Secuencia

55 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

60 gatcccatgg tggcctgttc ctatagtgag tcgtattagc tgc 43

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 43

65

Nombre de la secuencia: SEC ID 52

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 52

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

agctgcagct aatacgactc actataggaa caggccacca tgg 43

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 43

Nombre de la secuencia: SEC ID 53

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 53

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

ccaccatggg ccagaaggaa gtggagcaga actc 34

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 34

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 54

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 54

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

cgagagcccg tagaactgga cttg 24

55

<212> Tipos de ADN

60

<211> Longitud: 24

Nombre de la secuencia: SEC ID 55

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 55

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

gtggatccgg cggtgccggg tcgaacgctg gtgtactca gacccc 46

<212> Tipos de ADN

15

<211> Longitud: 46

Nombre de la secuencia: SEC ID 56

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 56

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

ccggtaccac ctccgctga accgctcca ccggtgacca caacctgggt ccctg 55

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 55

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 57

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 57

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

ctgagaattc ttatgactct ccgcggttga agctc 35

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 35

Nombre de la secuencia: SEC ID 58

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 58

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

tgacgaattc tgactetccg cgggtgaagc tc 32

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 32

Nombre de la secuencia: SEC ID 59

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 59

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

agctgcagct aatacgactc actatagg 28

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 28

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 60

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 60

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

ggccaccatg ggcaacgctg gtgtcactca gacccc 36

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 36

Nombre de la secuencia: SEC ID 61

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 61

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

tgaaccgcct ccaccgtctg ctctacccca ggcctcggcg 40

<212> Tipo: ADN

15

<211> Longitud: 40

Nombre de la secuencia: SEC ID 62

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 62

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

tgactctccg cgggtgaagc tc 22

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 22

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 63

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 63

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

cagctggggg aagcttcagt ttggagcag 29

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 29

Nombre de la secuencia: SEC ID 64

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 64

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

ctgctccaaa ctgaagcttc cccagctg 29

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 29

Nombre de la secuencia: SEC ID 65

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25

Nombre de la secuencia: SEC ID 65

Secuencia

30

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gtacttctgt gctcgaggc cgggactag 29

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 29

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 66

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 66

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

ctagtcccgg cctcgaggca cagaagtac 29

55

<212> Tipo: ADN

60

<211> Longitud: 29

Nombre de la secuencia: SEC ID 67

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 67

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10 <400> Hebra pre-secuencia:

cattttcagg gatagcaagc 20

<212> Tipo: ADN

15

<211> Longitud: 20

Nombre de la secuencia: SEC ID 68

20

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 68

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

tcacacagga aacagctatg tcacacagga aacagctatg 40

35

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 40

40 Nombre de la secuencia: SEC ID 69

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

45 Nombre de la secuencia: SEC ID 69

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

tgtgcctcga ggnnknnknn knnknnknnk cgaccagagc agtacttcg 49

55

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

60 Nombre de la secuencia: SEC ID 70

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Característica

Secuencia: SEC ID 70

5 <221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

10 <222> Localización a: 49

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

15

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 70

20

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

25 <400> Hebra pre-secuencia:

tggtcctcga ggccgnknkn knknknknkn nnkccagagc agtacttcgg gc 52

30 <212> Tipos de ADN

30

<211> Longitud: 52

Nombre de la secuencia: SEC ID 71

35

Descripción de la secuencia:

Característica

40

Secuencia: SEC ID 71

<221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de:

45

<222> Localización a:

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

50

CDSJoin: No

Característica

55

Secuencia: SEC ID 71

<221> FeatureKey: masc_feature

<222> Localización de: 1

60

<222> Localización a: 52

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

65

CDSJoin: No

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 71

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

tgtgcctcga ggccgnnknn knnknnknnk nnkcgaccag agcagtactt cg 52

15

<212> Tipo ADN

<211> Longitud: 52

Nombre de la secuencia: SEC ID 72

20

Descripción de la secuencia:

Característica

25

Secuencia: SEC ID 72

<221> FeatureKey: misc_feature

30

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 52

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

35

CDSioin: No

Codón preparado

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 72

Secuencia

45

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra Presecuencia:

tgtgcctcga ggccgnnknn knnknnknnk nnkggagggc gaccagagca g 51

50

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 51

55

Nombre de la secuencia: SEC ID 73

Descripción de la secuencia:

60

Característica

Secuencia: SEC ID 73

<221> FeatureKey: misc_feature

65

<222> Localización de: 1

ES 2 327 229 T3

<222> Localización a: 51

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

5 CDSJoin: No

Codón preparado

10 Nombre de la secuencia: SEC ID 73

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Presecuenciación:

20 tgtgcctcga ggccgggann knnknnknnk nnknnkgggc gaccagagca gtac 54

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 54

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 74

Descripción de la secuencia:

Característica

30 Secuencia: SEC ID 74

35 <221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de:

<222> Localización a:

40 Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

Característica

45 Secuencia: SEC ID 74

50 <221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 54

55 Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

Codón preparado

60 Nombre de la secuencia: SEC ID 74

Secuencia

65 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

tgtgctcga ggnnknnknn knnknnknnk ccagagcagt acttcgggc 49

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

Nombre de la secuencia: SEC ID 75

10

Descripción de la secuencia:

Característica

15

Secuencia: SEC ID 75

<221> FeatureKey: misc_feature

20

<222> Localización de:

<222> Localización a:

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

25

CDSJoin: No

Característica

30

Secuencia: SEC ID 75

<221> FeatureKey: misc_feature

35

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 49

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

40

CDSJoin: No

Codón preparado

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 75

Secuencia

50

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55

tgtgctcga ggnnknnknn knnknnknnk gagcagtact tcgggccg 48

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 48

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 76

Descripción de la secuencia:

65

Característica

Secuencia: SEC ID 76

ES 2 327 229 T3

<221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

5 <222> Localización a: 48

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

10

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 76

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

20

<400> Hebra pre-secuencia:

tggtcctcga gggnknknkn knknknknk cagtactcgc ggccgggc 48

25

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 48

Nombre de la secuencia: SEC ID 77

30

Descripción de la secuencia:

Característica

35

Secuencia: SEC ID 77

<221> FeatureKey: misc_feature

40

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 48

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

45

CDSJoin: No

Codón preparado

50

Nombre de la secuencia: SEC ID 77

Secuencia

55

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

60

tggtcctcga ggccgnknkn knknknkggg cgaccagagc agtactcgc 49

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

65

Nombre de la secuencia: SEC ID 78

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Característica

Secuencia: SEC ID 78

5 <221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de:

<222> Localización a:

10

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

15

Característica

Secuencia: SEC ID 78

20 <221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 49

25

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

30

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 78

35

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

40 <400> Hebra pre-secuencia:

aaactgaagc ttmnmnmnmn nmnmnmntgt aacggcacag aggtag 46

<212> Tipo: ADN

45

<211> Longitud: 46

Nombre de la secuencia: SEC ID 79

50

Descripción de la secuencia:

Característica

55 Secuencia: SEC ID 79

<221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

60

<222> Localización a: 46

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

65

CDSJoin: No

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 79

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

aaactgaagc ttmmnmnngc tgctmmtgt aacggcacag aggtag 46

15

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 46

Nombre de la secuencia: SEC ID 80

20

Descripción de la secuencia:

Característica

25

Secuencia: SEC ID 80

<221> FeatureKey: misc_feature

<222> Localización de: 1

30

<222> Localización a: 46

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

35

CDSJoin: No

Codón preparado

40

Nombre de la secuencia: SEC ID 80

Secuencia

45

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

aaactgaagc ttmmnmnmmn ngctgcmnn tgtaacggca cagaggtag 49

50

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 49

55

Nombre de la secuencia: SEC ID 81

Descripción de la secuencia:

60

Característica

Secuencia: SEC ID 81

<221> FeatureKey: misc_feature

65

<222> Localización de:

ES 2 327 229 T3

<222> Localización a:

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

5 CDSJoin: No

Característica

10 Secuencia: SEC ID 81

<221> FeatureKey: misc_feature

15 <222> Localización de: 1

<222> Localización a: 49

Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

20 CDSJoin: No

Codón preparado

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 81

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

aaactgaagc ttmnmnngc tgcmnnaac ggcacagagg tag 43

35 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 43

40 Nombre de la secuencia: SEC ID 82

Descripción de la secuencia:

Característica

45 Secuencia: SEC ID 82

<221> FeatureKey: misc_feature

50 <222> Localización de: 1

<222> Localización a: 43

55 Otra información: m is a or c; n is a or t or g or c; k is g o t

CDSJoin: No

Codón preparado

60 Nombre de la secuencia: SEC ID 82

Secuencia

65 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cgggactagc gggagggcga ccagagcagt ag 42

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

Nombre de la secuencia: SEC ID 83

10

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

15

Nombre de la secuencia: SEC ID 83

Secuencia

20

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25

ASRPGLAGGR PEQY 14

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 14

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 84

Descripción de la secuencia:

35

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

40

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cggggctgat gagtgcgtag ccagagcagt ac 42

<212> Tipo: ADN

45

<211> Longitud: 42

Nombre de la secuencia: SEC ID 85

50

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

55

Nombre de la secuencia: SEC ID 85

Secuencia

60

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65

ASRPGLMSAX PEQY 14

<212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 86

5 Descripción de la secuencia:

Característica

10 Secuencia: SEC ID 86

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

15 <222> Localización de: 1

<222> Localización a: 14

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

20 CDSJoin: No

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cggggctgag gtcggcgtag ccagagcagt ac 42

30 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

35 Nombre de la secuencia: SEC ID 87

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 87

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

ASRPGLRSAX PEQY 14

<212> Tipo: PRT

55 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 88

Descripción de la secuencia:

60

Característica

Secuencia: SEC ID 88

65 <221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

ES 2 327 229 T3

<222> Localización a: 14

Otra información sobre el codón: x indica un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

5 CDSJoin No

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 gcctcgaggc cgggactagc gggagggcga ccagaggcgt ag 42

<212> Tipos de ADN

<211> Longitud: 42

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 89

Descripción de la secuencia:

25 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 89

30 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 ASRPGLAGGR PEAX 14

<212> Tipo: PRT

40 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 90

Descripción de la secuencia:

45

Característica

Secuencia: SEC ID 90

50

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de:

55 <222> Localización a:

Otra información: x indica un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

60

Característica

Secuencia: SEC ID 90

65

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

ES 2 327 229 T3

<222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

5 CDSJoin: NO

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 gctcggaggc cgggactagc gggagggcga ccagaggatt ag 42

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 91

Descripción de la secuencia:

25 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 91

30 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 ASRPGLAGGR PEDX 14

<212> Tipo: PRT

40 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 92

Descripción de la secuencia:

45

Característica

Secuencia: SEC ID 92

50

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

55 <222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: NO

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

<400> Hebra pre-secuencia:

gctcggaggc cgggactagc gggagggcga ccagatcagt ag 42

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 93

Descripción de la secuencia:

10 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 93

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 ASRPGLAGGR PDQX 14

<212> Tipo: PRT

25 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 94

Descripción de la secuencia:

30

Característica

Secuencia: SEC ID 94

35

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de:

40 <222> Localización a:

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

45

Característica

Secuencia: SEC ID 94

50

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

55 <222> Localización a: 14

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cgggtctgta ggctgggcga ccagagcagt ac 42

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 95

Descripción de la secuencia:

10 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 95

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 ASRPGLXAGR PEQY 14

<212> Tipo: PRT

25 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 96

Descripción de la secuencia:

30

Característica

Secuencia: SEC ID 96

35 <221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de:

40 <222> Localización a:

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

45

Característica

Secuencia: SEC ID 96

50 <221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

55 <222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65 <400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cggggctggt tccggggcga ccagagcagt ag 42

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 97

Descripción de la secuencia:

10 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 97

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 ASRPGLVPGR PEQX 14

<212> Tipo: PRT

25 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 98

Descripción de la secuencia:

30

Característica

Secuencia: SEC ID 98

35

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de:

40 <222> Localización a:

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

45

Característica

Secuencia: SEC ID 98

50

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

55 <222> Localización a: 14

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cggggcttgt gtctgcttag ccagagcagt ac 42

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 99

Descripción de la secuencia:

10 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 99

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 ASRPGLVSAX PEQY 14

<212> Tipo: PRT

25 <211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 100

Descripción de la secuencia:

30

Característica

Secuencia: SEC ID 100

35 <221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

40 <222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

45

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

50 <400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cgggactagc gggagggcga ccacatccgt ag 42

55 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

Nombre de la secuencia: SEC ID 101

60

Descripción de la secuencia:

65 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 101

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

ASRPGLAGGR PHPX 14

10 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 102

15 Descripción de la secuencia:

Característica

20 Secuencia: SEC ID 102

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

25 <222> Localización de:

<222> Localización a:

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

30 CDSJoin: No

Característica

35 Secuencia: SEC ID 102

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

40 <222> Localización de: 1

<222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

45 CDSJoin: NO

Secuencia

50 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55 gcctcgaggc cgggactagc gggagggcga ccagatgcgt ag 42

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

60 Nombre de la secuencia: SEC ID 103

Descripción de la secuencia:

65 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 103

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

ASRPGLAGGR PDAX 14

<212> Tipo: PRT

10

<211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC 104

15

Descripción de la secuencia:

Característica

20

Secuencia: SEC 104

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

25

<222> Localización a: 14

Otra información: x incida un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

30

CDSJoin: No

Secuencia

35

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gcctcgaggc cgggtctgat tagtgcttag ccagagcagt ac 42

40

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 42

45

Nombre de la secuencia: SEC ID 105

Descripción de la secuencia:

50

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 105

55

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

60

ASRPGLISAX PEQY 14

<212> Tipo: PRT

65

<211> Longitud: 14

Nombre de la secuencia: SEC ID 106

ES 2 327 229 T3

Descripción de la secuencia:

Característica

5

Secuencia: SEC ID 106:

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

10

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 14

15

Otra información sobre el codón: x indica un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

Secuencia

20

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25

gccgttaca ctgacagctg ggggaagctt cag 33

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 33

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 107

Descripción de la secuencia:

35

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 107

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGKL Q 11

<212> Tipo: PRT

50

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 108

55

Descripción de la secuencia:

Secuencia

60

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

65

gccgttaca ctgacagctg ggggccgctt cag 33

<212> Tipo: ADN

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 109

5 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

10 Nombre de la secuencia: SEC ID 109

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 AVTTDSWGPL Q 11

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 110

Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 gccgttacaacgtgacagctggggaagatgcag 33

<212> Tipo: ADN

40 <211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 111

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 111

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

55

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGKM Q 11

60 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 112

65

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

gccgttaca ctgacagctg ggggaagttg cat 33

<212> Tipo: ADN

10

<211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 113

15

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

20

Nombre de la secuencia: SEC ID 113

Secuencia

25

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGKL H 11

30

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

35

Nombre de la secuencia: SEC ID 114

Descripción de la secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

45

gccgttaca ctgacagctg gggtagctt cat 33

<212> Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 115

Descripción de la secuencia:

55

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 115

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGXL H 11

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 116

Descripción de la secuencia:

10 Característica

Secuencia: SEC ID 116

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

15

<222> Localización de:

<222> Localización a:

20

Otra información: x incide un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

25 Característica

Secuencia: SEC ID 116

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

30

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 11

35

Otra información sobre el codón: x indica un residuo de aminoácido codificado por un codón ámbar

CDSJoin: No

40 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

45

gccgttacaac tgcacagctg gggggagctt cat 33

<212> Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 117

Descripción de la secuencia:

55

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 117

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGEL H 11

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 118

Descripción de la secuencia:

10 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 gccgttaca ctgacagctg gggggagctt cat 33

<212> Tipo: ADN 33

20 <211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 119

Descripción de la secuencia:

25

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 119

30

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

35

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGRL H 11

40 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 120

45

Descripción de la secuencia:

50 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

55 gccgttaca ctgacagctg ggggcagctt cat 33

<212> Tipos de ADN

<211> Longitud: 33

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 121

Descripción de la secuencia:

65

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 121

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGQL H 11

<212> Tipo: PRT

10

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 122

15

Descripción de la secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25

gccgttacaacgtgacagctggggaagggttcat 33

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 33

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 123

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 123

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

45

AVTTDSWGKV H 11

<212> Tipo: PRT

50

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 124

Descripción de la secuencia:

55

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

60

<400> Hebra pre-secuencia:

gccgttacaacgtgacagctggggaagggtgaat 33

65

<212> Tipo: ADN

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 125

5 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

10 Nombre de la secuencia: SEC ID 125

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20 AVTTDSWGKV N 11

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

25 Nombre de la secuencia: SEC ID 126

Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 gccgttaaa ctgacagctg ggggaagctt ctg 33

<212> Tipo: ADN

40 <211> Longitud: 33

Nombre de la secuencia: SEC ID 127

Descripción de la secuencia:

45

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 127

50

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

55

<400> Hebra pre-secuencia:

AVTTDSWGKL L 11

60 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 11

Nombre de la secuencia: SEC ID 128

65

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

ggaattcatc gatgcagaag gaagtgagc ag 32

<212> Tipos de ADN

10

<211> Longitud: 32

Nombre de la secuencia: SEC ID 129

15

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

20

Nombre de la secuencia: SEC ID 129

Secuencia

25

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

gtacacggcc gggtcagggt tctggatata c 31

30

<212> Tipo: ADN 31

<211> Longitud: 31

35

Nombre de la secuencia: SEC ID 130

Descripción de la secuencia:

40

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 130

Secuencia

45

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

50

tctctcatta atgaatgctg ggtgactca gacccc 36

<212> Tipo: ADN

55

<211> Longitud: 36

Nombre de la secuencia: SEC ID 131

Descripción de la secuencia:

60

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 131

65

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc 32

10 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 32

Nombre de la secuencia: SEC ID 132

15 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

20 Nombre de la secuencia: SEC ID 132

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

30 ctgctctggt tccgactc 19

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 19

35 Nombre de la secuencia: SEC ID 133

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 133

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

50 gagtgcggaa ccagagcag 19

<212> Tipo: ADN

55 <211> Longitud: 19

Nombre de la secuencia: SEC ID 134

Descripción de la secuencia:

60

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 134

65

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

atatccagaa cccggatcct gccgtgta 28

<212> Tipo: ADN

10

<211> Longitud: 28

Nombre de la secuencia: SEC ID 135

15

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

20

Nombre de la secuencia: SEC ID 135

Secuencia

25

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

tacacggcag gaatccgggt tctggatat 29

30

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 29

35

Nombre de la secuencia: SEC ID 136

Descripción de la secuencia:

40

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 136

45

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

50

ggagatatac atatgcagga ggtgacacag 30

<212> Tipo: ADN

55

<211> Longitud: 30

Nombre de la secuencia: SEC ID 137

Descripción de la secuencia:

60

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 137

65

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

tacacggcag gatccgggtt ctggatatt 29

5 <212>Tipo: ADN

<211> Longitud: 29

Nombre de la secuencia: SEC ID 138

10

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

15

Nombre de la secuencia: SEC ID 138

Secuencia

20

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25

ggagatatac atatgggtgt cactcagacc 30

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 30

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 139

Descripción de la secuencia:

35

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 139

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

cccaagctta gtctgctcta ccccaggcct cggc 34

<212>Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 34

Nombre de la secuencia: SEC ID 140

55

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 140

Secuencia

65

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

gccggccatg gccaaacagg aggtgacgca gattcct 37

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 37

Nombre de la secuencia: SEC ID 141

10

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

15

Nombre de la secuencia: SEC ID 141

Secuencia

20

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25 cttcttaaag aattcttaat taacctaggt tattaggaac ttctgggct ggggaag 57

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 57

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 142

Descripción de la secuencia:

35

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 142

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45 <400> Hebra pre-secuencia:

tcacagcgcg caggctggtg tctactcagac cccaaa 36

<212> Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 36

Nombre de la secuencia: SEC ID 143

55

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 143

Secuencia

65 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

cgagagcccc tagaactgga cttg 24

5 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 24

Nombre de la secuencia: SEC ID 144

10

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

15

Nombre de la secuencia: SEC ID 144

Secuencia

20

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25

tetctcatta atgaatgctg ggtgactca gacccc 36

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 36

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 145

Descripción de la secuencia:

35

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 145

40

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

<400> Hebra pre-secuencia:

tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg g 31

<212> Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 31

Nombre de la secuencia: SEC ID 146

55

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 146

Secuencia

65

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

	atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc	60
5	tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat	120
	tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc at\ tactcca atggtgacaa agaagatgga	180
	aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc	240
10	cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacia ctgacagctg ggggaaattg	300
	cagtttgag cagggaccca ggtgtggtc acccagata tccagaacct tgaccctgcc	360
	gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt	420
15	gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt	480
	gtgctagaca tgaggcttat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa	540
20	tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc	600
	cccagcccag aaagttccta a	621

<212> Tipo: ADN

25

<211> Longitud: 621

Nombre de la secuencia: SEC ID 147

30

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

35

Nombre de la secuencia: SEC ID 147

Secuencia

40

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

	atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg	60
45	acactgcagt gtgccagga tatgaacct gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca	120
	ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa	180
	gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg	240
50	tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga	300
	gggcgaccag agcagtactt cgggcccggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa	360
55	aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc	420
	caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc	480
	tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagacccgca gccctcaag	540
60	gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc	600
	accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg	660
	gagaatgacg agtgaccaca ggatagggcc aaaccctca cccagatcgt cagcgcagag	720
65	gcctgggqta gagcagacta a	741

ES 2 327 229 T3

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 741

5 Nombre de la secuencia: SEC ID 148

Descripción de la secuencia:

10 Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 148

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20

```
MQKEVEQNSG PLSVPEGAIA SLNCTYSDRG SQSFFWYRQY SGKSPELIMS IYNSGDKEDG      60
RFTAQLNKAS QYVSLIRDS QPSDSATYLC AVTTDSWGKL QFGAGTQVVV TPDIQNPDPA      120
25 VYQLRDSKSS DKSVCFLTDF DSQTNVSQSK DSDVYITDKC VLDMRSMDFK SNSAVAWSNK      180
SDFACANAFN NSIIPEDTFF PSPESS      206
```

30

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 206

35 Nombre de la secuencia: SEC ID 149

Descripción de la secuencia:

40 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

45

```
MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE      60
VPNGYNVSRs TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLAG GRPEQYFGPG TRLTVTEDLK      120
50 NVFPPEVAVF EPSEAEISHT QKATLVCLAT GFYPDHVELS WWVNGKEVHS GVCTDPQPLK      180
EQPALNDSRY ALSSRLRVSA TFWQDPRNHF RCQVQFYGLS ENDEWTQDRA KPVTQIVSAE      240
AWGRAD      246
```

55

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 246

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 150

Descripción de la secuencia:

65

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

```

      gttactacg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcg ggaacccta ttgtttatt   60
10    tttctaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat aaatgcttca   120
      ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt   180
      tttgctggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga   240
15    tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa   300
      gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttctccaatg atgagcactt ttaaagtctt   360
      gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgcggggcaa gagcaactcg gtcgccgcat   420
20    aactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga   480
      tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgcggc   540
      caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat   600
25    ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa   660
      cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac   720
30
35
40
45
50
55
60
65
```

ES 2 327 229 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa 780
 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggetggc tggtttattg ctgataaatc 840
 tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaaagcc 900
 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 960
 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta 1020
 ctcatatata ctttagattg atttaccccg gttgataatc agaaaagccc caaaaacagg 1080
 aagattgtat aagcaaatat ttaaattgta aacgtraata ttttgtaaa attcgcgta 1140
 aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat 1200
 aaatcaaaag aatagcccga gataggggtg agtggtggtc cagtttgga caagagtcca 1260
 ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc 1320
 ccactacgtg aaccatcacc caaatcaagt tttttggggc cgaggtgccg taaagcacta 1380
 aatcggaaacc ctaaagggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcg aacgtggcga 1440
 gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggta 1500
 cgctgcgctg aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtaaaagg 1560
 atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tccctaacg tgagttttcg 1620
 ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccctttttt 1680
 ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgttg 1740
 ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 1800
 ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acctcaagaa ctctgtagca 1860
 ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 1920
 tcgtgtctta cggggttggc ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgcg gcggtcgggc 1980
 tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 2040
 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagagaa ggcggacagg 2100
 tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaac 2160
 gcctggatc tttatagtcc tgcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 2220
 tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 2280
 ttcttggcct tttgctggcc ttttgcctac atgtaatgtg agttagctca ctcattaggc 2340
 accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcgata 2400
 acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctacgta taataatatt 2460
 ctatttcaag gagacagtca taatgaaata cctattgcct acggcagccg ctggattggt 2520
 attactcgcg gccagccgg ccatggccca gaaggaagtg gagcagaact ctggaccct 2580
 cagtgtcca gagggagcca ttgcctctct caactgcact tacagtgacc gaggttcca 2640
 gtccttcttc tggtagac aatattctgg gaaaagccct gagttgataa tgtccatata 2700
 ctccaatggt gacaaagaag atggaaggtt tacagcacag ctcaataaag ccagccagta 2760

ES 2 327 229 T3

tgtttctctg ctcatcagag actcccagcc cagtgattca gccacctacc tctgtgccgt 2820
 tacaactgac agctggggga aattgcagtt tggagcaggg acccaggttg tggtcacccc 2880
 5 agatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa 2940
 gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc 3000
 10 tgatgtgtat atcacagaca aatgtgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa 3060
 cagtgctgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag 3120
 cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt tccataatac ctagggttaat 3180
 15 taagaattct ttaagaagga gatatacata tgaaaaaatt attattcgca attcctttag 3240
 ttgttccttt ctattctcac agcgcgcagg ctggtgtcac tcagacccca aaattccagg 3300
 tcctgaagac aggacagagc atgacactgc agtgtgcccc ggatatgaac catgaataca 3360
 20 tgtcctggta tcgacaagac ccaggcatgg ggctgaggct gattcattac tcagttgggtg 3420
 ctggtatcac tgaccaagga gaagtcccca atggctacaa tgtctccaga tcaaccacag 3480
 aggatttccc gctcaggctg ctgtcggctg cccccccca gacatctgtg tacttctgtg 3540
 25 ccagcaggcc gggactagcg ggaggcgcac cagagcagta cttcgggccc ggcaccaggc 3600
 tcacggtcac agaggacctg aaaaacgtgt tcccaccga ggtcgtctgt tttgagccat 3660
 cagaagcaga gatctcccac acccaaaagg ccacactggt gtgcctggcc acaggcttct 3720
 30 accccgacca cgtggagctg agctgggagg tgaatgggaa ggagggtcac agtggggctc 3780
 gcacagacc gcagcccctc aaggagcagc ccgccctcaa tgactccaga tacgctctga 3840
 gcagccgcct gagggtctcg gccacctctc ggcaggaccc ccgcaaccac ttccgctgtc 3900
 35 aagtccagtt ctacgggctc tcggagaatg acgagtggac ccaggatagg gccaaacctg 3960
 tcaccagat cgtcagcgc gaggcctggg gtagagcaga cgcggccgca tctagacatc 4020
 atcaccatca tcactagact gttgaaagt gtttagcaaa accccataca gaaaattcat 4080
 40 ttactaacgt ctggaagac gacaaaact tagatcgta cgtaactat gagggttgtc 4140
 tgtggaatgc tacaggcgtt gtagtttgta ctggtgacga aactcagtt tacgggtacat 4200
 gggttcctat tgggcttgct atccctgaaa atgaggggtg tggctctgag ggtggcggtt 4260
 45 ctgaggggtg cggttctgag ggtggcggta ctaaaccctc tgagtacggt gatacaccta 4320
 ttccgggcta tacttatatc aacctctcg acggcactta tccgctggt actgagcaaa 4380
 accccgctaa tcctaatect tctcttgagg agtctcagcc tcttaatact ttcattgttc 4440
 50 agaataatag gttccgaaat aggcaggggg cattaactgt ttatacgggc actgttactc 4500
 aaggcactga ccccgttaa acttattacc agtacactcc tgtatcatca aaagccatgt 4560
 atgacgctta ctggaacggt aaattcagag actgcgcttt ccattctggc tttaatgagg 4620
 55 atccattcgt ttgtgaatat caaggccaat cgtctgacct gcctcaacct cctgtcaatg 4680
 ctggcggcgg ctctggtggt ggttctggtg gcggctctga ggggtggggc tctgaggggtg 4740
 gcggttctga ggggtggcggc tctgagggag gcggttccgg tgggtggctct ggttccgggtg 4800

60

65

ES 2 327 229 T3

5 attttgatta tgaaaagatg gcaaacgcta ataagggggc tatgaccgaa aatgccgatg 4860
aaaacgcgct acagtctgac gctaaaggca aacttgattc tgtcgctact gattacggtg 4920
ctgctatcga tggtttcatt ggtgacgttt ccggccttgc taatggtaat ggtgctactg 4980
gtgattttgc tggctcctaat tcccaaatgg ctcaagtcgg tgacggtgat aattcacctt 5040
10 taatgaataa tttccgtcaa tatttacctt cctccctca atcggttgaa tgtcgccctt 5160
ttgtctttag cgctggtaaa ccatatgaat tttctattga ttgtgacaaa ataaacttat 5160
tccgtgggtg ctttgcgttt cttttatag ttgccacctt tatgtatgta ttttctacgt 5220
ttgctaacat actgcgtaat aaggagctct aataaggtag cctctagtca aggcctatag 5280
15 tgagtcgtat tacggactgg ccgctgtttt acaacgctgt gactgggaaa accctggcgt 5340
taccacaactt aatgccttg cagcacatcc cctttcgcg agctggcgtat atagcgaaga 5400
20 ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcttcgc 5460
ttqqaataaa agcccgcctt gccgggcttt ttttt 5495

25 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 5495

Nombre de la secuencia: SEC ID 151

30 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

35 Nombre de la secuencia: SEC ID 151

Secuencia

40 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

45

50

55

60

65

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

5	agctgcagct aatacgactc actataggaa caggccacca tgggccagaa ggaagtggag	60
	cagaactctg gacccctcag tgttccagag ggagccattg cctctctcaa ctgcacttac	120
	agtgaccgag gttcccagtc cttcttctgg tacagacaat attctgggaa aagccctgag	180
10	ttgataatgt ccatatactc caatggtgac aaagaagatg gaaggtttac agcacagctc	240
	aataaagcca gccagtatgt ttctctgctc atcagagact cccagcccag tgattcagcc	300
	acctacctct gtgccgttac aactgacagc tgggggaaat tgcagtttg agcagggacc	360
15	caggttgtgg tcaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gatccggcgg tggcgggtcg	420
	aacgctggtg tctctcagac cccaaaattc caggctctga agacaggaca gagcatgaca	480
	ctgcagtgtg cccaggatat gaacctatgaa tacatgtcct ggtatcgaca agaccaggc	540
20	atggggctga ggctgattca ttactcagtt ggtgctggta tctctgacca aggagaagtc	600
	cccaatggct acaatgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctgctgtcg	660
	gctgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagca ggccgggact agcgggaggg	720
25	cgaccagagc agtacttcgg gccgggcacc aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac	780
	gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa	840
	aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg	900
30	tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag	960
35	cagcccgcc tcaatgactc cagatacgtc ctgagcagcc gcctgagggg ctcggccacc	1020
	ttctggcagg acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag	1080
	aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cccgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc	1140
40	tggggtagag cagacggtgg aggcggttca ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca	1200
	gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagttcgccc	1260
	gtcacaaga gttcaaccg cggagagtca taagaattct cag	1303

45

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 1303

50

Nombre de la secuencia: SEC ID 152

Descripción de la secuencia:

55

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 152

60

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

65

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

5	MGQKEVEQNS GPLSVPEGAI ASLNCTYSOR GSQSFFWYRQ YSGKSPELIM SIYNSGDKED	60
	GRFTAQLNKA SQYVSLIIRD SPSDSATYLC AVTTDSWGKL QFGAGTQVVV TGGGGSGGGG	120
	SGGGGSNAGV TQTPKFQVLK TGQSMTLQCA QDMNHEYMSW YRQDPGMGLR LIHYSVGAGI	180
10	TDQGEVPNGY NVSRSTTEDF PLRLLSAAPS QTSVYFCASR PGLAGGRPEQ YFGPGTRLTV	240
	TEDLKNVFPF EVAVFEPSEA EISHTQKATL VCLATGFYPD HVELSWVWNG KEVHSGVSTD	300
	PQPLKEQPAL NDSRYALSSR LRVSATFWQD PRNHFRQCQVQ FYGLSENDEW TQDRAKPVTV	360
15	IVSAEAWGRA DGGGGSLSSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGES	416

20 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 416

Nombre de la secuencia: SEC ID 153

25 Descripción de la secuencia:

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35	ctgctttccc ggagcactat gcggataaaa atatccaatt acagtactat tattacaaa	60
	gaatctgcag tccaccgtga aaagcccctt tacacgcgcc ttggggataa acaataaaaa	120
	agatttatgt aagtttatac ataggcgagt actctgttat tgggactatt tacgaagtta	180
40	ttataacttt ttccttctca tactcataag ttgtaaaggc acagcgggaa taagggaaaa	240
	aacgccgtaa aacggaagga caaaaacgag tgggtccttg cgaccacttt cattttctac	300
	gacttctagt caaccacgt gctcaccaa tgtagcttga cctagagttg tcgccattct	360
45	aggaactctc aaaagcgggg cttcttgcaa aaggttacta ctcgtgaaaa tttcaagacg	420
	atacaccgcg ccataatagg gcataactgc ggcccgttct cgttgagcca gcggcgtag	480
	tgataagagt cttactgaac caactcatga gtggtcagtg tcttttcgta gaatgcctac	540
50	cgtactgtca ttctcttaat acgtcacgac ggtattggta ctactattg tgacgccggt	600

55

60

65

ES 2 327 229 T3

	tgaatgaaga ctgrrtctag cctcctggct tcctcgattg gcgaaaaaac gtgtttgtacc	660
	ccctagtaca ttgagcggaa ctagcaaccc ttggcctcga cttacttcgg tatggtttgc	720
5	tgctcgcact gtgggtgctac ggacatcggt accgrrttrg caacgcgrrt gataattgac	780
	cgcttgatga atgagatcga agggccgrrg ttaattatct gacctacctc cgccattttc	840
	aacgrrctgg tgaagacgg agccgggaag gccgaccgac caaataacga ctattttagac	900
10	ctcggccact cgcaccaga gcgccatagt aacgrrctga ccccgrrcta ccattcggga	960
	gggatagca tcaatagatg tgctgccccr cagrrcgrtr atacctactt gctttatctg	1020
	tctagcgact ctatccacgg agtgactaat tcgrraacat tgacagrrctg grrcfaatga	1080
15	gtatatatga aatcraacta aatrrrtgaag taaaaattaa atrrrrcctag atccactrrt	1140
	aggaaaaact attagagrac rggrrrrtagg gaattgrrct caaaagcaag rrgactcgcra	1200
	grctrgggca rrrrrrrctag rrrrrcragaa gaactcragg aaaaaagac gcgcattaga	1260
20	cgacgaacgr rrrrrrrrrr grrrgcgatg rrcgcccacca aacaaacggc ctagrrrrctc	1320
	atggrrtgaga aaaaggrrrc crrrrgaccga agrcgrrrctc cgrrratgrr rratgacagg	1380
	aagatcacat cggcatcaat ccgrrgrrga agrrrrrrag acatcgrrrg ggarrrtatgg	1440
25	agcgagacga rraggacaat grrcaccgac gacgrrcacc gctattcagc acagaatggc	1500
	ccaacctgag rrrrrcrrat aatgrrcrrat rrcgrrcrrc cagccccgact rrrrrrrrra	1560
	gcacgrrrgt cggrrcgaac rrrcrrrrgt ggarrrgrrc rrrcrrrrat garrrrcrrc	1620
30	rrgatactrr rrrcrrrrrr gaagrrrrc rrrrrrrrrc crrrrrrrrc crrrrrrrra grrcrrrrrr	1680
	cgrrrrrrrc rrrrrrrrrc grrrrrrrrc rrraaagrrc crrrrrrrrg accatagaaa	1740
	rarrcaggaca grrrraaagc grrgagactg aactcrrcagc taaaaacact acgagcagrr	1800
35	ccccgcrrc ggarrrcrrr rrrcrrrrrr rrcgrrcrrg rrcgrrcrrg aarrgrraa gaccgrraaa	1860
	cgaccgrraa acgagrrrac aagaaagrac gcaatagrrg actaaagacac crrrrrrrrat	1920
	aarrgrrgrra actcactcga crrrrgrrg crrcrrrrrrc rrrrrrrrrc rrrrrrrrrc	1980
40	grrcactcrrc crrrrcrrrr rrrcrrrrrr atgrrrrrrg crrgagagrrg crrcrraaacc	2040
	grraaarraat rrrrrrracc grrrrrrrra aagrrrrrrc crrrrrrrrc rrrrrrrrrc	2100
	rrcrrrraat aactcraatc garrrrgrra rrrrrrrrrc crraaarrrr aarracrrag	2160
45	grrgagcrra caacacacrr raaactcrrc crrrrrrrra agrrrrrrrc rrrrrrrrrc	2220
	rrrractaat crrrrrrrrc grrcrrrrat crrgrrrra rrrrrrrrrc rrrrrrrrrc	2280
	agrrrrrrcrr grrrrcrrgrr rarrrraccg gcagrraaar grrrrcrrcrr rrrcrrrrrr	2340
50	gggaccgrra rggrrrrraat rrrcrraaac rrrrrrrrrg grraaagrrgrr crrcrrcrrat	2400
	atcrrrrrrc crrrrcrrrr rrrcrrrraa grrrrrrrra grrrrrrrrc rrrcrrrrrr	2460
	crrcrrrrrrc grrraaaaag aggarrrrrc agracrrrra raaarrrrrr crrraaccac	2520
55	grrgagrrca rrrrrrrrrc grrrrrrrrc rrrraarrrr grrcrrrrrrc rrrrrcrrrr	2580
	rrrrrrcrrc crrcrrrrrr crrrraaacga crrrrrrrrc agrrcrrrrc rrrrrrrrrc	2640
	crrrrcrrrrc crrrrcrrrr acacrrrrrr caaaarrrrc agrrrrrrrc rrrrrcrrrr	2699

60 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 2699

65 Nombre de la secuencia: SEC ID 154

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 154

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

```
ccatgggcca gaaggaagtg gagcagaact ctggaccctt cagtgttcca gagggagcca      60
ttgcctctct caactgcaact tacagtgacc gaggttccca gtccttcttc tggtagagac      120
aatattcttg gaaaagccct gagttgataa tgtccatata ctccaatggt gacaaagaag      180
atggaaggtt tacagcacag ctcaataaag ccagccagta tgtttctctg ctcatcagag      240
actcccagcc cagtgattca gccacctacc tctgtgccgt tacaactgac agctggggga      300
aattgcagtt tggagcaggg acccaggttg tggtcaccgg tggaggcggg tcaggcggag      360
gtggatccgg cggtagcggg tcgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggtcc      420
tgaagacagg acagagcatg acaactgcagt gtgcccagga tatgaacat gaatacatgt      480
cctggtatcg acaagaccca ggcattggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg      540
gtatcactga ccaaggagaa gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg      600
atttcccgtc caggctgctg tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca      660
gcaggccggg actagcggga gggcgaccag agcagtactt cgggcccggc accaggtca      720
cggtcacaga ggacctgaaa aacgtgttcc caccgaggt cgtgtgttt gagccatcag      780
aagcagagat cttccacacc caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggtttctacc      840
ccgaccacgt ggagctgagc tggtaggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca      900
cagaccgcga gccctcaag gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca      960
gccgctgag ggtctcggcc accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag     1020
tccagttcta cgggctctcg gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccctca      1080
cccagatcgt cagcgcagag gcctgggta gagcagacgg tggaggcggg tcaactcagca     1140
gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca     1200
cccacaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa ccgaggagag tcataagaat     1260
tc
```

45

<212> Tipo: ADN

50

<211> Longitud: 1262

Nombre de la secuencia: SEC ID 155

55

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 155

Secuencia

65

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

```
5      gctggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg      60
      cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg      120
      gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc      180
10     aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct      240
      gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagge cgggactagc gggaggggta      300
      ccagagcagt acttcggggc gggcaccagg ctcacgggtca cagaggacct gaaaaacgtg      360
15     tccccaccg aggtcgtctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag      420
      gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctcgacc acgtggagct gagctgggtg      480
      gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag      540
20     cccgccctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgaggggtct gcccaccttc      600
      tggcaggacc cccgcaacca ctccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat      660
      gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg      720
25     ggtagagcag ac      732
```

<212> Tipo: ADN

30 <211> Longitud: 732

Nombre de la secuencia: SEC ID 156

35 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

40 Nombre de la secuencia: SEC ID 156

Secuencia

45 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

```
50     AGVTQTPKFQ VLKTGQSMTL QCAQDMNHEY MSWYRQDPGM GLRLIHYSVG AGITDQGEVP      60
      NGYNVSRSTT EDFPLRLLSA APSQTSVYFC ASRPLAGGX PEQYFGPGTR LVTEDLKNV      120
      FPPEVAVFEP SEAEISHTQK ATLVCLATGF YPDHVELSWW VNGKEVHSGV CTDQPPLKEQ      180
55     PALNDSRYAL SSRLRVSATF WQDPRNHFRQ QVQFYGLSEN DEWTQDRAKP VTQIVSAEAW      240
      GRAD      244
```

60 <212> Tipos de ADN

<211> Longitud: 244

65 Nombre de la secuencia: SEC ID 157

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Característica

Secuencia: SEC ID 157

5 <221> FeatureKey: MISC_FEATURE

<222> Localización de: 1

<222> Localización a: 244

10

Otra información: X indica un residuo de aminoácido codificado por un codón ópalo, que normalmente se traduce a triptófano

CDSJoin: No

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

20

<400> Hebra pre-secuencia:

25

gctggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 60

tagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 120

gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 180

30

aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 240

gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcaggc cgggactagc gggaggcga 300

ccagagcagt acttcgggcc gggcaccagg ctcacggtca cagaggacct gaaaaacgtg 360

35

ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctcca cacccaaaag 420

gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctggtgg 480

gtgaatggga aggagggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540

40

cccgcctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 600

tggcaggacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660

gacgagtgga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720

45

ggtagagcag ac 732

50

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 732

Nombre de la secuencia: SEC ID 158

55

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

60

Nombre de la secuencia: SEC ID 158

Secuencia

65

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

5	gctgggtgca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg	60
	cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg	120
	gggctgagge tgattcatta ctcagttggt gctggatca ctgaccaagg agaagtcccc	180
10	aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct	240
	gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gcctcgagge cggggctgat gagtgcggaa	300
	ccagagcagt acttcgggcc gggcaccagg ctcacggca cagaggacct gaaaaacgtg	360
15	ttcccaccgg aggtcgtgt gttgagcca tcagaagcag agatctcca cacccaaaag	420
	gccacactgg tgtgcctggc caccggtttc taccctgacc acgtggagct gagctggtgg	480
	gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag	540
20	cccgcctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc	600
	tggcaggacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat	660
	gacgagtgga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccacaga tcgtcagcgc cgaggcctgg	720
25	ggtaqaqcaq actaagcttg aattc	745

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 745

Nombre de la secuencia: SEC ID 159

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 159

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

50	MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE	60
	VPNGYNVSRs TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLMS AEPEQYFGPG TRLTVTEDLK	120
	NVFPPEVAVF EPSEAEISHT QKATLVCLAT GFYPDHVELS WWVNGKEVHS GVCTDPQPLK	180
55	EQPALNDSRY ALSSRLRVSA TFWQDPRNHF RCQVQFYGLS ENDEWTQDRA KPVTQIVSAE	240
	AWGRAD	246

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 246

Nombre de la secuencia: SEC ID 160

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

```
AGVTQTPKFQ VLKTGQSMTL QCAQDMNHEY MSWYRQDPGM GLRLIHYSVG AGITDQGEVP 60
10 NGYNVSRSTT EDFPLRLLSA APSQTSVYFC ASRPGLSAQ PEQYFGPGTR LTVTEDLKNV 120
FPPEVAVFEP SEAEISHTQK ATLVCLATGF YPDHVELSWW VNGKEVHSGV CTDPPQLKEQ 180
PALNDSRYAL SSRLRVSATF WQDPRNHFRQ QVQFYGLSEN DEWTQDRAKP VTQIVSAEAW 240
15 GRAD 244
```

<212> Tipo: PRT

20 <211> Longitud: 244

Nombre de la secuencia: SEC ID 161

25 Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

30 <400> Hebra pre-secuencia:

```
atgcaggagg tgacacagat tccctgcagct ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttggtt 60
35 ctcaactgca gtttcaactga tagcgctatt tacaacctcc agtggttttag gcaggaccct 120
gggaaaggct tcacatctct gttgcttatt cagtcaagtc agagagagca aacaagtgga 180
agacttaatg cctcgctgga taaatcatca ggacgtagta ctttatacat tgcagcttct 240
40 cagcctggcg actcagccac ctacctctgt gctgtgaggc ccacatcagg aggaagctac 300
atacctacat ttggaagagg aaccagcctt attgttcatt cgtatatcca gaaccctgac 360
cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 420
45 gatthtgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta taccacagac 480
aaatgtgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtgtg ggcctggagc 540
50 aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 600
ttcttcccca gccagaaag ttcctaa 627
```

55 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 627

Nombre de la secuencia: SEC ID 162

60 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

65 Nombre de la secuencia: SEC ID 162

ES 2 327 229 T3

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

5 <400> Hebra pre-secuencia:

```
    atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg    60
    cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg    120
10  gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc    180
    aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct    240
    gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag    300
15  ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca    360
    cccgaggctc ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca    420
    ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat    480
20  gggaggaggg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc    540
    ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcttgaggg tctcggccac cttctggcag    600
    gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcggg gaatgacgag    660
25  tggacccagg ataggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga    720
    gcagactaa                                     729
```

<212> Tipo: ADN

30 <211> Longitud: 729

Nombre de la secuencia: SEC ID 163

35 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

40 Nombre de la secuencia: SEC ID 163

Secuencia

45 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

```
    MQEVTQIPAA LSVPEGENLV LNCSFTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLI QSSQREQTSG    60
50  RLNASLDKSS GRSTLYIAAS QPGDSATYLC AVRPTSGGSY IPTFGRGTSL IVHPYIQNPD    120
    PAVYQLRDSK SSDKSVCLFT DFDSQTNVSQ SKDSOVYITD KCVLDMRSMD FKSNSAVAWS    180
    NKSDFACANA FNNSIIPEDT FFPSPSS                                     208
```

55 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 208

60 Nombre de la secuencia: SEC ID 164

Descripción de la secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

	MGVTQTPKFQ VLKTGQSM TL QCAQDMNHEY MSWYRQDPGM GLRLIHYSVG AGITDQGEVP	60
5	NGYNVSRSTT EDFPLRLLSA APSQTSVYFC ASSYVGNTGE LFFGEGSRLT VLEDLKNVFP	120
	PEVAVFEPSE AEISHTQKAT LVCLATGFYP DHVELSWWVN GKEVHSGVCT DPQPLKEQPA	180
	LNSRYALSS RLRVSATFWQ DPRNHFRQV QFYGLSENDE WTQDRAKPV T QIVSAEAWGR	240
10	AD	242

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 242

15 Nombre de la secuencia: SEC ID 165

 Descripción de la secuencia:

20 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

25 <400> Hebra pre-secuencia:

	ttcctggcct tttgctggcc ttttgcctcac atgtaatgtg agttagctca aaggaccgga	60
	aaacgaccgg aaaacgagtg tacattacac tcaatcgagt ctcattaggc accccaggct	120
30	ttacacttta tgcttccggc tcgatatgtg gagtaatccg tgggggccga aatgtgaaat	180
	acgaaggccg agcatacaac tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaca	240
	gctatgacca acaccttaac actcgcctat tgttaaagtg tgcctttgt cgatactggt	300
35	tgattacgcc aagctacgta cttaaagtatt ctatttcaag gagacagtca actaatgagg	360
	ttcgatgcat gaattcataa gataaagttc ctctgctcagt taatgaaata cctattgcct	420
	acggcagccg ctggattggt attactcgcg attactttat ggataacgga tgccgctggc	480
40	gacctaaaca taatgagcgc gcccagccgg ccatggccaa acaggagggtg acgcagattc	540
	ctgcagctct cgggctggcc ggtaccgggt tgcctccac tgcgtctaag gacgtcgaga	600
	gagtgctcca gaaggagaaa acttggttct caactgcagt ttcactgata ctcacagggt	660
	cttctcttt tgaaccaaga gttgacgtca aagtgactat gcgctattta caacctccag	720
45	tggtttaggc aggaccctgg gaaaggtctc cgcgataaat gttggagggtc accaaatccg	780
	tcctgggacc ctttccagag acatctctgt tgcttattca gtcaagtcag agagagcaaa	840
	caagtggag tgtagagaca acgaataagt cagttcagtc tctctcgttt gttcaccttc	900
50	acttaatgcc tcgctggata aatcatcagg acgtagtact ttatacattg tgaattacgg	960
	agcgacctat ttagtagtcc tgcacatga aatatgtaac cagcttctca gcctggtgac	1020
	tcagccacct acctctgtgc tgtgaggccc gtcgaagagt cggaccactg agtcggtgga	1080
55	tggagacacg aactccggg acatcaggag gaagctacat acctacattt ggaagaggaa	1140
	ccagccttat ttagtctctc cttcgatgta tggatgtaa cttctctctt ggtcggaaata	1200
	tgttcatccg tatatccaga acccggatcc tgcctgtgac cagctgagag acaagtaggc	1260
60	atataggtct tgggcctagg acggcacatg gtcgactctc actctaaatc cagtgacaag	1320
	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct tgagatttag gtcactgttc agacagacgg	1380
	ataagtggct aaaactaaga caaacaaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata	1440
	tcacagacaa gtttgtttac acagtgtttc attcctaaga ctacacatat agtgtctgtt	1500
65	atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg tacacacgat	1560

ES 2 327 229 T3

```

ctgtactcca gatacctgaa gttctcgttg tcacgacacc cctggagcaa caaatctgac 1620
5   tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc ggacctcgtt gtttagactg aaacgtacac 1680
   gtttgcgga gttgttgtcg attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt 1740
   cctaataacc taataaggtc ttctgtggaa gaaggggtcg ggtctttcaa ggattattgg 1800
10  taggtaatt aagaattctt taagaagggg atatacatat gaaaaatta atccaattaa 1860
   ttcttaagaa attcttcccc tatatgtata ctttttaaat ttattcgcaa ttcctttagt 1920
   tgttcctttc tattctcaca gcgcgcaggc aataagcgtt aaggaaatca acaaggaaag 1980
15  ataagagtgt cgcgcgctccg tggtgtcact cagaccccaa aattccaggt cctgaagaca 2040
   ggacagagca accacagtga gtctgggggtt ttaagggtcca ggacttctgt cctgtctcgt 2100
   tgacactgca gtgtgcccag gatatgaacc atgaatacat gtcctggtat actgtgacgt 2160
20  cacacgggtc ctatacttgg tacttatgta caggaccata cgacaagacc caggcatggg 2220
   gctgaggctg attcattact cagttgggtc gctgttctgg gtccgtaccg cgactccgac 2280
   taagtaatga gtcaaccacg tggatcact gaccaaggag aagtcccaa tggtacaat 2340
25  gtctccagat accatagtga ctggttcctc ttcaggggtt accgatgta cagaggtcta 2400
   caaccacaga ggatttcccc ctcaggctgc tgtcggctgc tccctcccag gttggtgtct 2460
   cctaaagggc gagtccgacg acagccgacg agggagggtc acatctgtgt acttctgtgc 2520
30  cagcagttac gtcgggaaca ccggggagct tgtagacaca tgaagacacg gtcgtcaatg 2580
   cagcccttgt ggcccctcga gtttttggga gaaggctcta ggctgaccgt actggaggac 2640
   ctgaaaaacg caaaaaacct cttccgagat ccgactggca tgacctctg gacttttgc 2700
35  tgttcccacc cgaggtcgct gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc acaagggtgg 2760
   gctccagcga cacaaactcg gtagtcttcg tctctagagg cacacccaaa aggccacact 2820
   ggtgtgcctg gccacaggct tctaccccga gtgtgggttt tccggtgtga ccacacggac 2880
40  cgggtgtccga agatggggct ccacgtggag ctgagctggt ggggtgaatgg gaaggaggtg 2940
   cacagtgggg ggtgcacctc gactcgacca cccacttacc cttcctccac gtgtcacccc 3000
   tctgcacaga cccgcagccc ctcaaggagc agcccgcct caatgactcc agacgtgtct 3060
45  gggcgctcgg gagttcctcg tcgggcggga gttactgagg agatacgtc tgagcagccg 3120
   cctgagggtc tcggccacct tctggcagga tctatgcgag actcgtcggc ggactcccag 3180
   agccgggtga agaccgtcct cccccgaac cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg 3240
50  ctctcggaga gggggcgttg gtgaaggcga cagttcaggt caagatgccc gagagcctct 3300
   atgacgagtg gaccaggat agggccaaac ccgtcaccca gatcgtcagc tactgctcac 3360
55  ctgggtccta tcccggtttg ggcagtgggt ctagcagtcg gccgaggcct ggggtagagc 3420
   agacgcggcc gcacggctcc ggaccccatc tcgtctgcgc cggcgt 3466

```

60 <212> Type: DNA

<211> Longitud: 3466

Nombre de la secuencia: SEC ID 166

65

Descripción de la secuencia:

ES 2 327 229 T3

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 166

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

10

<400> Hebra pre-secuencia:

KYLLPTAAAG LLLLAAPAM AKQEVQIPA ALSVPEGENL VLNCSFTDSA IYNLQWFRQD 60
PGKGLTSLLL IQSSQREQTS GRLNASLDKS SGRSTLYIAA SQPGDSATYL CAVRPTSGGS 120
15 YIPTFGRGTS LIVHPYIQNP DPAVYQLRDS KSSDKSVCLF TDFDSQTNVS QSKDSDVYIT 180
DKCVLDMRSM DFKSNSAVAW SNKSDFACAN AFNNSIIPED TFFPSPESSM KKLLFAIPLV 240
VPFYSHSAQA GVTQTPKFQV LKTGQSMTLQ CAQDMNHEYM SWYRQDPGMG LRLIHYSVGA 300
20 GITDQGEVFN GYNVSRSTTE DFPLRLLSAA PSQTSVYFCA SSVVGNTGEL FFGEGSRLTV 360
LEDLKNVFPF EVAVFEPSEA EISHTQKATL VCLATGFYPD HVELSWWVNG KEVHSGVCTD 420
PQPLKEQPAL NDSRYALSSR LRVSATFWQD PRNHFRQVQ FYGLSENDEW TQDRAKPVTV 480
25 IVSAEAWGRA DAAA 494

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 494

30

Nombre de la secuencia: SEC ID 167

Descripción de la secuencia:

35

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

40

<400> Hebra pre-secuencia:

ggatccatgg ccataagtgg agtccctgtg ctaggatttt tcatcatagc tgtgctgatg 60
agcgcctcagg aatcatgggc tatcaaaga gaacatgtga tcatccaggc cgagttctat 120
45 ctgaatcctg accaatcagg cgagttatg tttgacttg atggtgatga gattttccat 180
gtggatatgg caaagaagga gacggtctgg cggcttgaag aatttgacg atttgccagc 240
tttgaggctc aagggtgatt ggccaacata gctgtggaca aagccaacct ggaaatcatg 300
50 acaaagcgtc ccaactatac tccgatcacc aatgtacctc cagaggtaac tgtgctcacg 360
aacagccctg tggaaactgag agagcccaac gtcctcatct gtttcatcga caagttcacc 420
ccaccagtgg tcaatgtcac gtggcttcca aatggaaaac ctgtcaccac aggagtgtca 480
55 gagacagtct tcctgcccag ggaagaccac cttttccgca agttccacta tctccccctc 540
ctgccctcaa ctgaggacgt ttacgactgc aggggtggagc actggggctt ggatgagcct 600
cttctcaagc actgggagtt tgatgctcca agccctctcc cagagactac agagaacgtg 660
60 gatgggggtc tgaactgatac actccaagcg gagacagatc aacttgaaga caagaagtct 720
gcggtgcaga ccgagattgc caatctactg aaagagaagg aaaaactaga gttcatcctg 780
gcagcttacg gatctgggtg tggcttgaac gatatttttg aagctcagaa aatcgaatgg 840
65 catgagtagg atcc 854

<212> Tipo: ADN

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 854

Nombre de la secuencia: SEC ID 168

5 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

10 Nombre de la secuencia: SEC ID 168

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

20	aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga gataagattg	60
	aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcggt ggcacaacta ttacaatgc ggccaagtta	120
	taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg tttgcgtagc	180
	tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac cctagtattg	240
25	gagcaataat cgatttaacc aacacgtcta aatattatga tgggtgtgcat tttttgcggg	300
	cgggcctggt atacaaaaaa attcaagtac ctggccagac tttgccgcct gaaagcatag	360
	ttcaagaatt tattgacacg gtaaaagaat ttacagaaaa gtgtcccggc atgtttggtg	420
30	gcgtgcaactg cacacacggt attaatcgca ccggttacat ggtgtgcaga tattaatgc	480
	acaccctggg tattgcccgc caggaagcca tagatagatt cgaaaaagcc agaggtcaca	540
	aaattgaaag acaaaaattac gttcaagatt tattaattta attaatatta tttgcattct	600
35	ttaacaaata ctttatccta ttttcaaatt gttgcgcttc ttccagcgaa ccaaaactat	660
	gcttcgcttg ctccgtttag cttgtagccg atcagtggcg ttgttccaat cgacggtagg	720
	attaggccgg atattctcca ccacaatgtt ggcaacggtg atgttacgtt tatgcttttg	780
40	gttttccacg tacgtctttt ggccggtaat agccgtaaac gtagtgccgt cgcgcgtcac	840
	gcacaacacc ggatgtttgc gcttgtccgc ggggtattga accgcgcgat ccgacaaatc	900
	caccactttg gcaactaaat cggtgacctg cgcgtctttt ttctgcatta tttcgtcttt	960
45	cttttgcatg gtttcctgga agccggtgta catgcggttt agatcagtca tgacgcgcgt	1020
	gacctgcaaa tctttggcct cgatctgctt gtccttgatg gcaacgatgc gttcaataaa	1080
	ctcttgtttt ttaacaagtt cctcggtttt ttgcccacc accgcttgca gcgcggttgt	1140
50	gtgctcggtg aatgtcgcaa tcagcttagt caccaactgt ttgctctcct cctcccgttg	1200
	tttgatcgcg ggatcgtagt tgccggtgca gagcacttga ggaattactt cttctaaaag	1260
	ccattcttgt aattctatgg cgtaaggcaa tttggacttc ataatcagct gaatcacgcc	1320
55	ggatttagta atgagcactg tatgcgctg caaatacagc gggtcgcccc ttttcacgac	1380
	gctgttagag gtagggcccc cattttggat ggtctgctca aataacgatt tgtattttatt	1440
	gtctacatga acacgtatag ctttatcaca aactgtatat tttaaactgt tagcgacgtc	1500
60	cttgccacg aaccggacct gttggtcgcg ctctagcacg taccgcaggt tgaacgtatc	1560
	ttctccaaat taaaattctc caattttaac gcgagccatt ttgatacacg tgtgtcgatt	1620
	ttgcaacaac tattgttttt taacgcaaac taaacttatt gtggttaagca ataattaaat	1680
65	atgggggaac atgcccgcct acaacactcg tcgttatgaa cgagacggc gccggctctcg	1740
	gcgcaagcgg ctaaaacgtg ttgcccgttc aacgcggcaa acatcgcaaa agccaatagt	1800

ES 2 327 229 T3

acagttttga tttgcatatt aacggcgatt ttttaaatta tcttatttaa taaatagtta 1860
 5 tgacgcctac aactccccgc ccgcttgac tcgctgcacc tcgagcagtt cgttgacgcc 1920
 ttcctccgtg tggccgaaca cgtcagcgg gtggtcagtg accagcggcg tgccgcacgc 1980
 gacgcacaag tatctgtaca ccgaatgatc gtcgggcgaa ggcacgctcg cctccaagtg 2040
 10 gcaatattgg caaatcga aatatataca gttgggttgt ttgcgcatat ctatcgtggc 2100
 gttgggcatg tacgtccgaa cgttgatttg catgcaagcc gaaattaaat cattgcgatt 2160
 agtgcgatta aaacgttgta catcctcgtc tttaatcatg ccgctgatta aatcgcgcaa 2220
 15 tcgagtcgag tgatcaaagt gtggaataat gttttctttg tattccccgag tcaagcgcag 2280
 cgcgtatttt aacaaactag ccattcttga agttagtttc atttaatgca actttatcca 2340
 ataatatatt atgtatcgca cgtcaagaat taacaatgcg cccgttgtcg catctcaaca 2400
 20 cgactatgat agagatcaaa taaagcgcga attaaatagc ttgcgacgca acgtgcacga 2460
 tctgtgcacg cgttccggca cgagctttga ttgtaataag tttttacgaa gcgatgacat 2520
 gacccccgta gtgacaacga tcacgccaa aagaactgcc gactacaaaa ttaccgagta 2580
 25 tgtcggtgac gttaaaacta ttaagccatc caatcgaccg ttagtccaat caggaccgct 2640
 ggtgcgagaa gccgcgaagt atggcgaatg catcgtataa cgtgtggagt ccgctcatta 2700
 gagcgtcatg tttagacaag aaagctacat atttaattga tcccgatgat tttattgata 2760
 30 aattgacctt aactccatac acggtattct acaatggcgg ggttttggtc aaaatttccg 2820
 gactgcgatt gtacatgctg ttaacggctc cgcccactat taatgaaatt aaaaattcca 2880
 attttaaaaa acgcagcaag agaaacattt gtatgaaaga atgcgtagaa ggaagaaaa 2940
 35 atgtcgtcga catgctgaac aacaagatta atatgcctcc gtgtataaaa aaaatattga 3000
 acgatttgaa agaaaacaat gtaccgcgcg gcggtatgta caggaagagg tttatactaa 3060
 actgttacat tgcaaacgtg gtttcgtgtg ccaagtgtga aaaccgatgt ttaatcaagg 3120
 40 ctctgacgca tttctacaac cacgactcca agtgtgtggg tgaagtcag catcttttaa 3180
 tcaaatccca agatgtgtat aaaccaccaa actgccaaaa aatgaaaact gtcgacaagc 3240
 tctgtccgtt tgctggcaac tgcaagggtc tcaatcctat ttgtaattat tgaataataa 3300
 45 aacaattata aatgctaaat ttgtttttta ttaacgatac aaaccaaacg caacaagaac 3360
 atttgtagta ttatctataa ttgaaaacgc gtagtataa tcgctgaggt aatatttaaa 3420
 atcattttca aatgattcac agttaatttg cgacaatata attttatttt cacataaact 3480
 50 agacgccttg tcgtcttctt ctctgtattc ctctctttt tcatttttct cctcataaaa 3540
 attaacatag ttattatcgt atccatataat gtatctatcg tatagagtaa atttttggtt 3600
 gtcataaata taratgtctt ttttaatggg gtgtatagta ccgctgcgca tagttttctt 3660
 55 gtaatttaca acagtgcctt tttctggtag ttcttcggag tgtgttgctt taattattaa 3720
 atttatataa tcaatgaatt tgggatcgtc ggttttgtag aatatgttgc cggcatagta 3780
 60 cgcagcttct tctagttcaa ttacaccatt ttttagcagc accggattaa cataactttc 3840

65

ES 2 327 229 T3

caaaatggtg tacgaaccgt taaacaaaaa cagttcacct cccttttcta tactattgtc 3900
 tgcgagcagt tgtttgtgtg taaaaataac agccattgta atgagacgca caaactaata 3960
 5 tcacaaactg gaaatgtcta tcaatatata gttgctgatg atccagcatg ataagataca 4020
 ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa 4080
 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttccgagtt 4140
 10 tgtcagaaaag cagaccaaac agcggttgga ataatagcga gaacagagaa atagcggcaa 4200
 aaataatacc cgratcactt ttgctgatat ggttgatgtc atgtagccaa atcgggaaaa 4260
 acgggaagta ggctcccatg ataaaaagt aaaagaaaa gaataaacg aacatccaaa 4320
 15 agtttgtgtt ttttaaatag tacataatgg atttccttac gcgaaatagc ggcagacatg 4380
 gcctgcccgg ttattattat ttttgacacc agaccaactg gtaatggtag cgaccggcgc 4440
 tcagctggaa ttcagatctg tgattgtaaa taaaatgtaa tttacagtat agtattttaa 4500
 20 ttaatataca aatgatttga taataattct ttttaacta taatatattg tgttgggtg 4560
 aattaaaggc cccggcatcc tcaaatgcat aatttcatag tccccctgt tgtaagtgat 4620
 gcgtatttct gaatctttgt aaaatagcac acaagactcc aacgcgttg gcgttttatt 4680
 25 ttcttgctcg actctagttt attaggcctc tagagatccg ttttatagg ttttttatt 4740
 acaaaactgt tacgaaaaca gtaaaatact ttttatttg cgagatggtt atcattttaa 4800
 ttatctccat gatccaataa acctagaata aagggccga ctttaattc aaccaaacac 4860
 30 aatatattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat taaaatacta 4920
 tactgtaaat tacattttat ttacaatcac agatcccggg gatccggtta ttagtacatt 4980
 tattaagcgc tagattctgt gcgttgttga tttacagaca attgttgtac gtattttaat 5040
 35 aattcattaa atttataatc tttagggttg tatgttagag cgaaaatcaa atgattttca 5100
 gcgtctttat atctgaattt aaatattaaa tcctcaatag atttgtaaaa taggtttcga 5160
 40 ttagtttcaa acaagggttg tttttccgaa ccgatggctg gactatctaa tggattttcg 5220
 ctcaacgcca caaaacttgc caaatcttgt agcagcaatc tagctttgtc gatattcgtt 5280
 tgtgttttgt tttgtaataa aggttcgacg tcgttcaaaa tattatgcgc ttttgtattt 5340
 45 ctttcatcac tgtcgttagt gtacaattga ctcgacgtaa acacgttaaa taaagcttgg 5400
 acatatttaa catcgggctt gttagcttta ttaggccgat tategtcgtc gtcccaacct 5460
 tcgtcgttag aagttgcttc cgaagacgat tttgccatag ccacacgacg cctattaatt 5520
 50 gtgtcggcta acacgtccgc gatcaaattt gtagttgagc tttttggaat ttttctgat 5580
 tgcgggcgtt tttgggcggg tttcaatcta actgtgcccg attttaattc agacaacacg 5640
 ttagaaaagc atggtgcagg cgggtgtaac atttcagacg gcaaatctac taatggcggc 5700
 55 ggtggtggag ctgatgataa atctaccatc ggtggaggcg caggcggggc tggcggcggg 5760
 ggcggaggcg gaggtggtgg cgggtgatgca gacggcgggt taggctcaaa tgtctcttta 5820
 ggcaacacag tcggcacctc aactattgta ctggtttcgg gcgccgtttt tggtttgacc 5880

60

65

ES 2 327 229 T3

5 5940 ggtctgagac gagtgcgatt tttttcgttt ctaatagctt ccaacaattg ttgtctgtcg
 6000 tctaaagggtg cagcgggttg aggttccgtc ggcattggtg gagcgggagg caattcagac
 6060 atcgatgggtg gtggtaggtg tggaggcgct ggaatgtagt gcacgggaga aggtggtggc
 6120 ggcggtgccg ccggtataat ttgttctggt ttagtttggt cgcgcacgat tgtgggcacc
 6180 ggcgcaggcg ccgctggctg cacaacggaa ggtcgtctgc ttcgaggcag cgcttgggtt
 10 6240 ggtggcaatt caatattata attggaatac aaatcgtaaa aatctgctat aagcattgta
 6300 atttcgctat cgtttaccgt gccgatattt aacaaccgct caatgtaagc aattgtattg
 15 6360 taaagagatt gtctcaagct cggatcgatc ccgcacgccg ataacaagcc ttttcatttt
 6420 tactacagca ttgtagtggc gagacacttc gctgtcgtcg acgtacatgt atgctttggt
 6480 gtcaaaaacg tcgttggcaa gctttaaaat atttaaaaga acatctctgt tcagcaccac
 20 6540 tgtgttgtcg taaatgttgt ttttgataat ttgcgcttcc gcagtatcga cacgttcaaa
 6600 aaattgatgc gcatcaattt tgttgttctt attattgaat aaataagatt gtacagattc
 6660 atatctacga ttcgtcatgg ccaccacaaa tgctacgctg caaacgctgg tacaatttta
 25 6720 cgaaaactgc aaaaacgta aaactcggta taaaataatc aacgggcgct ttggcaaaat
 6780 atctatttta tcgcacaagc ccactagcaa attgtatttg cagaaaacaa tttcggcgca
 6840 caattttaac gctgacgaaa taaaagtta ccagttaatg agcgaccacc caaattttat
 30 6900 aaaaatctat ttaatcacg gttccatcaa caaccaagtg atcgtgatgg actacattga
 6960 ctgtcccgat ttatttgaaa cactacaaat taaaggcgag ctttcgtacc aacttgtag
 7020 caatattatt agacagctgt gtgaagcgct caacgatttg cacaagcaca atttcataca
 35 7080 caacgacata aaactcgaaa atgtcttata tttcgaagca cttgatcgcg tgtatgtttg
 7140 cgattacgga ttgtgcaaac acgaaaactc acttagcgtg cacgacggca cgttggagta
 7200 ttttagtccg gaaaaaatc gacacacaac tatgcacggt tcgtttgact ggtacgcggc
 40 7260 gtgttaacat acaagttgct aaccggcggc cgacacccat ttgaaaaaag cgaagacgaa
 7320 atgttgact tgaatagcat gaagcgtcgt cagcaataca atgacattgg cgttttaaaa
 7380 cacgttcgta acgttaacgc tcgtgacttt gtgtaactgc taacaagata caacatagat
 45 7440 thtagactca caaattacaa acaaattata aaacatgagt ttttgcgta aaaatgccac
 7500 ttgttttacg agragaattc ccagcttggc actggccgct gttttacaac gtcgtgactg
 7560 ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg
 50 7620 gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg
 7680 cgaatggcgc ctgatgcggt attttctct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat
 7740 atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgatag ttaagccagc cccgacacc
 55 7800 gccaacaccg gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca
 7860 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg
 7920 cgcggacgaa agggcctcgt gatacgctta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg

60

65

ES 2 327 229 T3

gtttcttaga cgtcaggtag cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 7980
 ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 8040
 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 8100
 5 tttttgctg cattttgctt tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa 8160
 gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacatcg aactggatct caacagcgg 8220
 aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagt 8280
 10 ctgctatgtg gcgaggatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 8340
 atacactatt ctgagaatga cttggttagg tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg 8400
 gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 8460
 15 gccaaactac tctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac 8520
 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 8580
 aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgca caaactatta 8640
 20 actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 8700
 aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa 8760
 tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag 8820
 25 cctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 8880
 agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgct agaccaagt 8940
 tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg 9000
 aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccctaac gtgagtttc gttccactga 9060
 gcgctagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttagg atcctttttt tctgctgta 9120
 30 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgtt gccggatcaa 9180
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 9240
 gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 9300
 40 tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctcgtgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 9360
 accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 9420
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 9480
 45 cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg 9540
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 9600
 ctttatagtc ctgctcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 9660
 50 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 9720
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgctgtat cccctgatc tggtgataac 9780
 cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcggcga gccgaacgac cgagcgcagc 9840
 55 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgc aaccgcctct ccccgcgct 9900
 tggccgattc ataatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag 9960
 cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg 10020
 60 cttccggctc gtatgtgtg tggattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc 10080
 tatgaccatg attacg 10096

65 <212> Tipo: ADN

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 10096

Nombre de la secuencia: SEC ID 169

5 Descripción de la secuencia:

Codón preparado

10 Nombre de la secuencia: SEC ID 169

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

```
20   ggtaccggat ccagcatggt gtgtctgaag ctccctggag gctcctgcat gacagcgcctg   60
    acagtgacac tgatgggtgct gagctccccca ctggctttgt ccggagacac cggacctaaag   120
    tacgtcaagc agaacacact gaaactggct tccgggtggcg gatctctagt tccacgcggt   180
25   agtggaggcg gtggttccgg agacacgcgt ccacgtttct tgtggcagct taagtttgaa   240
    tgtcatttct tcaatgggac ggagcgggtg cggttgctgg aaagatgcat ctataaccaa   300
    gaggagtccg tgcgcttcga cagcgcctg ggggagtacc gggcggtgac ggagctgggg   360
30   cggcctgatg ccgagtactg gaacagccag aaggacctcc tggagcagag gcgggcccgcg   420
    gtggacacct actgcagaca caactacggg gttggtgaga gcttcacagt gcagcggcga   480
    gttgagccta aggtgactgt gtatccttca aagaccagc ccctgcagca ccacaacctc   540
35   ctggtctgct ctgtgagtgg tttctatcca ggcagcattg aagtcagggtg gttccggaac   600
    ggccaggaag agaaggctgg ggtggtgtcc acaggcctga tccagaatgg agattggacc   660
    ttccagaccc tggatgatgct ggaaacagtt cctcggagtg gagaggttta cacctgccaa   720
    gtggagcacc caagtgtgac gagccctctc acagtggaat ggagagcacg gtctgaatct   780
    gcacagagca aggtcgacgg aggcggtggg ggtagaatcg cccggtgga ggaaaaagtg   840
45   aaaaccttga aagctcagaa ctcgagctg gcgtccacgg ccaacatgct cagggaacag   900
    gtggcacagc ttaaacagaa agtcatgaac tactaggatc c   941
```

50 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 941

55 Nombre de la secuencia: SEC ID 170

Descripción de la secuencia:

Codón preparado

Nombre de la secuencia: SEC ID 170

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

ES 2 327 229 T3

<400> Hebra pre-secuencia:

5 MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE 60
VPNGYNVSR S TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLAG GRPEQYFGPG TRLTVT 116

<212> Tipo: PRT

10 <211> Longitud: 116

Nombre de la secuencia: SEC ID 171

15 Descripción de la secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

25 MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE 60
VPNGYNVSR S TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLMS AXPEQYFGPG TRLTVT 116

30 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 116

Nombre de la secuencia: SEC ID 172

35 Descripción de la secuencia:

Característica

40 Secuencia: SEC ID 172

<221> FeatureKey: MISC_FEATURE

45 <222> Localización de: 1

<222> Localización a: 116

Otra información: Donde x es e, q o r

50 CDSJoin: No

Secuencia

55 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

60 MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE 60
VPNGYNVSR S TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLAG GRPEDQYFGP GTRLTVT 117

65 <212> Tipo: PRT

ES 2 327 229 T3

<211> Longitud: 117

Nombre de la secuencia: SEC ID 173

5 Descripción de la secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

15 MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE 60
VPNGYNVSR S TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLVP GRPEQFGPG TRLTVT 116

20 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 116

Nombre de la secuencia: SEC ID 174

25 Descripción de la secuencia:

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Secuencia sintética

<400> Hebra pre-secuencia:

35 MNAGVTQTPK FQVLKTGQSM TLQCAQDMNH EYMSWYRQDP GMGLRLIHYS VGAGITDQGE 60
VPNGYNVSR S TTEDFPLRLL SAAPSQTSVY FCASRPGLAG GRPHPQFGPG TRLTVT 116

40 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 116

Nombre de la secuencia: SEC ID 175

45 Descripción de la secuencia:

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de fago que presenta en su superficie un polipéptido TCR de una cadena (scTCR) o un par polipeptídico de TCR dimérico (dTCR), en el que dicho scTCR está constituido por un primer segmento una secuencia del dominio variable de la cadena α o δ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia del dominio variable de la cadena β o γ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, una secuencia espaciadora que liga el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento, o viceversa, y

un puente disulfuro entre los segmentos primero y segundo, en el que dicho puente disulfuro es uno que no tiene equivalente en los receptores de células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nativos; en el que dicho par polipeptídico de dTCR está constituido por un primer polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena α o δ del TCR fusionada con el extremo N de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR

un segundo polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena β o γ del TCR está fusionada con el extremo N de una secuencia correspondiente a la secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, los polipéptidos primero y segundo, en el que están unidos por un puente disulfuro que no tiene equivalente en los receptores de células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nativos, en el que dicho puente disulfuro entre los segmentos primero y segundo del scTCR, o entre los polipéptidos primero y segundo del dTCR, entre las cisternas sustituidas por los siguientes pares de residuos en el exón 1 de TRAC*01 para la cadena α del TCR y TRBC1*0 o TRBC2*01 para la cadena β del TCR:

Cadena α del TCR	Cadena β del TCR
Thr 48	Ser 57
Thr 45	Ser 77
Tyr 10	Ser 17
Thr 45	Asp 59
Ser 15	Glu 15

2. Una partícula de fago según la reivindicación 1, que es una partícula de fago filamentosos.

3. Una partícula de fago según la reivindicación 1 o 2, en la que el extremo C de un miembro del par polipeptídico del dTCR, o el extremo C del polipéptido scTCR, está unido mediante un enlace peptídico a un residuo expuesto en la superficie de la partícula de fago.

4. Una partícula de fago según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el polipeptídico scTCR o el polipéptido dTCR es humano y dicho puente disulfuro está entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01.

5. Una partícula de fago según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipeptídico del scTCR o el polipeptídico dTCR es de mamífero aparte de humano y dicho puente disulfuro está entre los residuos de cisteína sustituidos por los equivalentes mamíferos relevantes de Thr48 del exón 1 de TPAC*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01 de los TCR humanos.

6. Una partícula de fago según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el TCR está truncado por el extremo C en el caso de un dTCR, o en extremo C en el caso de un scTCR, con respecto a dichos receptores de células T nativos de modo que los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro entre cadenas del TCR nativo están excluidas.

7. Una partícula de fago según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro entre cadenas nativo están sustituidos por residuos que no son cisteína.

8. Una partícula de fago según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los dTCR o scTCR presentados no presentan residuo de cisteína no apareado correspondientes a un residuo de cisteína no apareado presente en el TCR nativo.

9. Una partícula de fago según la reivindicación 1, que es una partícula de fago filamentosos que presenta en su superficie un par polipeptídico receptor de células T dimérico (dTCR), en que dicho par está constituido por un primer polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena α del TCR está fusionada con el extremo

ES 2 327 229 T3

N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena α del TCR, y un segundo polipéptido en el que una secuencia del dominio variable de la cadena β del TCR está fusionada con el extremo N correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β del TCR, en los que los polipéptidos primero y segundo están unidos por un puente disulfuro entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr48 del exón 1 de TRAC*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1*01 o TRBC2*01, el extremo C de un miembro del par polipeptídico dTCR está unido mediante un enlace peptídico a una proteína de la cubierta del fago.

10. Una biblioteca diversa de partículas de fago según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

10 11. Una biblioteca diversa según la reivindicación 10, en la que la diversidad reside en el(los) dominio(s) variables del par polipeptídico dTCR o polipéptido scTCR.

12. Un procedimiento para la identificación de TCR con una característica específica, en el que dicho procedimiento comprende someter una biblioteca diversa de TCR presentados sobre partículas de fago según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 a un proceso de selección que selecciona según dicha característica, y aislar partículas de fago que presentan un TCR que posee dicha característica, y, opcionalmente, a un procedimiento de amplificación para multiplicar las partículas aisladas y/o un proceso de detección selectiva que mide dicha característica, identificando las partículas de fago que presentan un TCR con la característica deseada y aislar estas partículas de fago y, opcionalmente, a un procedimiento de amplificación para multiplica las partículas aisladas.

13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que la característica específica es la mayor afinidad por un ligando del TCR.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1a

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccectcagtggtccagagggagccatt
gcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttctcttggtacaga
caatatctcgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggtgacaaa
gaagatggaagggttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctc
atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaactgac
agctgggggaaattgcagtttggagcagggaccaggttgtggtcaccccagatate
cagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctc
gtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattct
gatgtgtatatcacagacaaa[redacted]gtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc
aacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaac
aacagcattatccagaagacacctcttcccagcccagaaagtctctaa

(SEC ID 147)

Figura 1b

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgccaggatataaaccatgaatacatgtcctgggtatcgacaa
gaccagcatggggtgaggtgattcattactcagttgggtgctgggtatcaactgac
caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
ctcaggetgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagctacttcgggcccgggcaccagggtcacg
gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttc
taccgacacagctggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtc[redacted]acagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac
gctctgagcagccgcctgagggctctggccaccttctggcaggacccccgcaaccac
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgggagaatgacgagtggaaccaggat
agggccaaacccgctacccagatcgtcagcgcggaggcctggggtagagcagactaa

(SEC ID 148)

Figura 2a

MQ
KEVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLLRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
DVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS
PESS*
(SEC ID 149)

Figura 2b

M
NAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG
RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDPRNHR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*
(SEC ID 150)

Figura 3

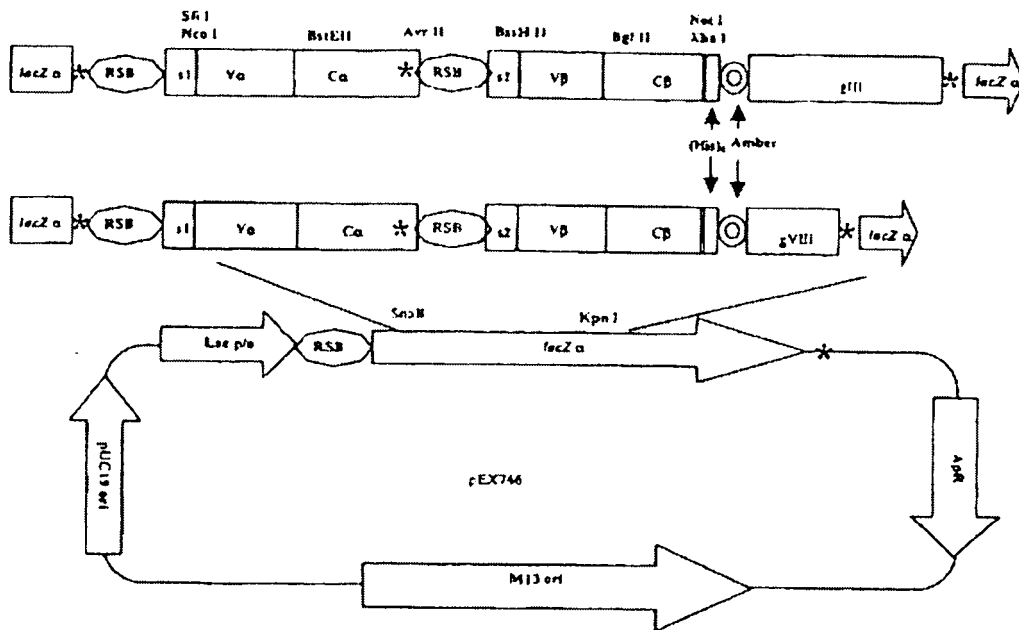


Figura 4

```

1 gttactacg tcaggtaggca cttttcgggg aaatgtgagc ggaacccecta tttgtttatt
61 tttctaanta cattcaasta tglatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca
121 ataataattga aaaaggaaga gtagtagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt
181 ttttgccgca ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga aagtaaaga
241 tgcgaaagat cagttgggtg cagcagtggt ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
301 gatecctgag agttttcgcc ccgaagaacg ttctccaatg atgagcactt ttaaagttct
361 gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgcggggcaa gagcaactcg gtcgcccgat
421 acactattct cagaatgact tggttgagta ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga
481 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgccc
541 caecttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggageta accgcttttt tgcacaacat
601 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa
661 cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtgc batggcaaca acgltgcgca aactattaac
721 tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa
781 agttgcagga ccactctctc gctcggccct tccggctggc tggtttaltg ctgataaatc
841 tggagccggg gagcgtgggt ctgcccgtat caltgcagca ctggggccag atgtaagcc
901 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag
961 acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttaa
1021 ctcatatata ctttagattg atttacccc gttgataatc agaaaagccc caaaaacagg
1081 aagattgtat aagcaaatat ttaaattgta aacgttaata tttgtttaa attcgctta
1141 aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat
1201 aaatcaaaag aatagcccca gatagggttg agtgtgttcc cagtttggaa cabaggtcca
1261 ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc
1321 ccaatcgtg aaccatcacc caaatcaagt tttttgggtt cgaggtgccc caaagcacta
1381 aatcggaaac ctaaaagggg cccccgattt agagcttgc ggggaaagcg aacgtggcga
1441 gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggtea
1501 cgctgcgctg aaccaccaca cccgcccgcg ttaatgcgcc gctacagggc gcgtaaaagg
1561 atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg
1621 ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat ctcttgaga ctctttttt
1681 ctgcccgtaa tctgctgctt gcaaaaaaa aaaccaccgc taccagggg ggtttgtttg
1741 ccggatcaag agctaccaac tcttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata
1801 ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca
1861 ccgectacat acctcgtctt gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag
1921 tcgtgtctta ccgggttggc ctaaacagca tagttaccgg ataagggcga gcgctgggc
1981 tgaacggggg gtctcgtgac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga
2041 taccacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg
2101 tatccggtaa gcggcagggg cggaaacagga gagcgcacga gggagcttcc aggggaaac
2161 gcctggtatc tttatagtc tgctgggttt cgcacctctt gacttgagcg tcyattttt
2221 tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg
2281 ttccctggct tttgctggcc ttttgcctac atgtaattgt agttagctca ctcattaggc
2341 accccaggct ttacacttta tgcttcggc tcgatgttg tgtggaattg tgagcggata
2401 acaatttcac acaggaaca gctatgacca tgattacgcc aagctacgta taataatatt
2461 ctatttcaag gagacagtc taatgaata cctattgctt accgagccg ctggattggt
2521 attactcgcg gccagcccg ccatggccca gaaggagtg gagcagaact ctggaccct
2581 cagtggtcca gagggagcca ttgctctct caactgcact tacagtgacc gaggttcca
2641 gtccttcttc tggtagacac aatattctgg gaaaagccct gagttgataa tgtccatata
2701 ctccaatggt gacaaagaag atggaaggtt tacagcacag ctcaataaag ccagccagta
2761 tgtttctctg ctcatcagag actcccagcc cagtgttca gccacctacc tctgtgccc
2821 tacaactgac agctggggga aattgcagtt tggagcaggg acccaggttg tggtcacccc
2881 agatattcag aacctgacc ctgcccgtga ccagctgaga gactctaat ccagtgaaca
2941 gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaaaaaat gtgtcacaaa gtaaggattc
3001 tgatgtgtat atcacagaca aatgtgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa
3061 cagtgctgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcatgt gcaaacgcct tcaacaacag
3121 cattattcca gaagacacct tcttcccag cccagaaagt tectaataac ctaggttaat
3181 taagaaattc ttaagaagga gatatacata tgaaaaaatt attattcgca atctcttag
3241 tgttctctt ctattctcac agcgcgagc ctgggtctac tcagacccca aaatccagg
3301 tctgaagac aggacagagc atgacactgc agtgtgccc ggateatgaa catgaataca
3361 tgcctggta tcgacaagac ccaggcatgg ggctgaggct gattcattac tcagtgggtg

```


Figura 5

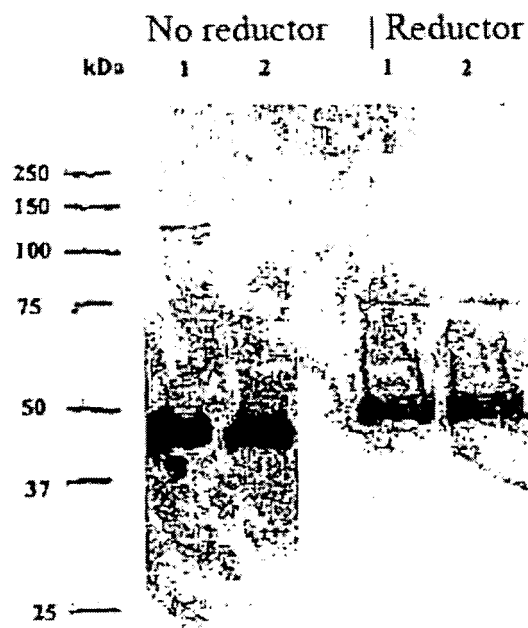


Figura 6

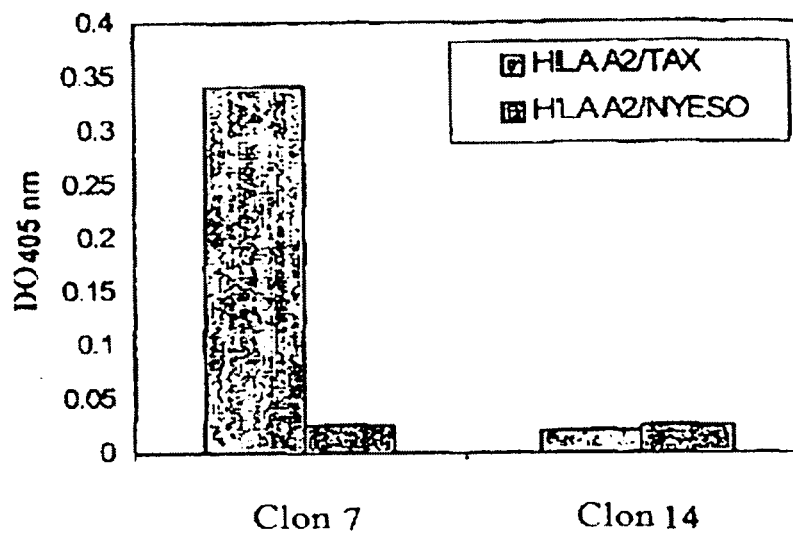


Figura 7a

Esquema del constructo de presentación al ribosoma del scTCR A6-C-Kappa

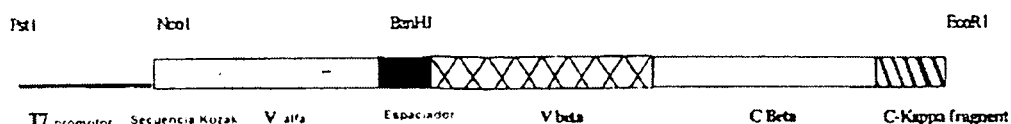


Figura 7b

```

agctgcagct aatacgactc actataggaa caggccacca tgggccagaa
ggaagtggag cagaactctg gacccctcag tgttccagag ggagccattg
cctctctcaa ctgcacttac agtgaccgag gttcccagtc cttcttctg
tacagacaat attctgggaa aagccctgag ttgatdaatgt ccatatactc
caatggtgac aaagaagatg gaaggtttac agcacagctc aataaagcca
gccagtatgt ttctctgctc atcagagact cccagcccag tyattcagcc
acctacctct gtgccgttac aactgacagc tgggggaaat tgcagtttgg
agcagggacc caggttgtgg tcaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg
gatccggcgg tggcgggtcg aacgctggtg tcaactcagac cccaaaatc
caggtcctga agacaggaca gagcatgaca ctgcagtggtg cccaggatat
gaaccatgaa tacatgtcct ggtatcgaca agaccaggc atggggctga
ggctgatcca ttactcagtt ggtgctggtg tcaactgacca aggagaagtc
cccaatggct acaatgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag
gctgctgctg gctgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagca
ggccgggact agcgggaggg cgaccagagc agtacttcgg gccgggcacc
aggetcaccg tcacagagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtcgc
tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccaccccac aaggccacac
tgggtgtcct ggccacagge ttctaccctg accacgtgga gctgagctgg
tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcagag acccgcagcc
cctcaaggag cagcccgcct tcaatgaetc cagatagct ctgagcagcc
gcctgagggt ctgggccacc ttctggcagg acccccgcaa ccacttcgc
tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggaccagga
tagggccaaa cccgtcacce agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag
cagacggtgg aggcggttca ctcagcagca ccctgacgct gagcaagca
    
```

ES 2 327 229 T3

gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct

gagttcgccc gtcacaaaga gcttcaaccg cggagagtca taagaattct

cag

(SEC ID 152)

Figura 7c

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

(SEC ID 153)

ES 2 327 229 T3

Figura 8

Secuencia de pUC19-T7

```

1 ctgctttccc ggagcactat gcggataaaa atatcceaatt acagtactat tattaccaaa gaatctgcag
71 tccaccgtga aaagccccctt tacacgcgccc ttggggataaa acaataaaaa ngatttatgt aagtttatac
141 ataggcgagt actctgttat tgggactatt tacgaagtta ttataacctt ttccttctca tactcataag
211 ttgtaaaggc acagcgggaa taagggaaaa aacgccgtaa aacggaagga caaaaacgag tgggtctttg
281 cgaccacttt cattttctac gacttctagt caaccacgt gctcacccaa tgtagcttga cctagagttg
351 tcgccattct aggaactctc aaaagcgggg cttcttgcaa aaggttacta ctcgtgaaaa ttcaagacg
421 atacaccgcg ccataatagg gcataactgc gccccgttct cgttgagcca gcggcgatg tgataagagt
491 ctactgaac caoctcatga gtggtcagt tcttttcgta gaatgcctac cgtactgtca ttctctaat
561 acgtcacgac ggtattggta ctcactattg tgacgccggt tgaatgaaga ctggtgctag cctcctggt
631 tctctgattg gcgaaaaaac gtgtgtacc ccttagtaca ttgagcggaa ctagaacccc ttggcctcga
701 cttacttcgg tatggtttgc tgctcgcact gtgggtctac ggacatcgtt accggtgttg caacgcggtt
771 gataaattgac cgcttgatga atgagatcga agggccgttg ttaattatct gacctacctc gcctatttc
841 aacgtctcgg tgaagacgag agccgggaag gccgaccgnc caaataacga ctatttagac ctcgccact
911 cgacaccaga gcgccatagt aacgtcgtga ccccggtcta ccatcggga gggcatagca tcaatagatg
981 tgcTgcccct cagtcggtg atacctaett gctttatctg tctagcgact ctatccacgg agtgactaat
1051 tcgtaaccat tgacagctcg gttcaaatga gtatatatga aatctaacta aatlttgaag taaaaattaa
1121 attttcttag atccacttct aggaaaaact attagagtac tggttttagg gaattgcact caaaaagcaag
1191 gtgactcgca gtctggggca tcttttctag ttctctagaa gaactctagg aaaaaagac gcgcattaga
1261 cgacgaacgt ttgtttttt ggtggcgatg gtcgccacca aacaacccgc ctagtctctg atggttgaga
1331 aaaaggcttc cattgaaccga agtcgtctcg cgtctatggt ttatgacagg aagatcacat cggcatcaat
1401 ccggtggtga agttcttgag acatcgtggc ggatgtatgg agcgagacga ttaggacaat ggtcacgac
1471 gacgggtcacc gctattcagc acagaaatgg ccaacctgag ttctgctatc aatggcctat tccgcgtcgc
1541 cagcccgact tgcccccaaa gcacgtgtgt cgggtcgaac ctgccttgct ggatgtggct tgaactctatg
1611 gatgtcgac tcgatactct ttgcgggtgc gaagggcttc cctctttccg cctgtccaba ggccatcgc
1681 cgtcccagcc ttgtctctc cgtgctccc tcgaaggctc ccctttcgg accatagaaa tctcaggaca
1751 gccccaaagc gtggagactg aactcgcagc taaaaacact acgagcagtc cccccccctc ggataccttt
1821 ttgcggtcgt tgcgccgaa aaatgccaaag gaccggaaaa cgaccgaaa acgagtgtac aagaaaggac
1891 gcaatagggg actaagacac ctattggcat aatggcgaa actcactcga ctatggcgag cggcgtcggc
1961 ttgctggctc gcgtcgctca gtcactcgt ccttcgcctt ctcgcggtt atgctgttgg cggagagggg
2031 cgcgcaaccg gctaagtaat tacgtcgacc gtgctgtcca aagggctgac ctttcgccc tcaactcgtt
2101 tgcgttaatt acactcaatc gagtgagtaa tccgtgggt ccgaaatgtg aactacgaa gccgagcata
2171 caacacacct taacactcgc ctattgttaa agtgtgtcct ttgtcgatc tggactaat gcggttcgac
2241 gtcgattatg ctgagtgata tctctgtccg gtggtaccct aggggccat ggctcgagct taagtaccg
2311 gcagcaaaaat gttgcagcac tgaccctttt gggaccgcaa tgggttgaat tagcggaacg tctgttaggg
2381 ggaagcgggt cgaccgcatt atcgtctctc cggcggtggc tagcgggaa ggttgtcaac gcgtcggact
2451 taccgcttac cgcggactac gccataaaag aggaatcgt agacacgcca taagatgtgg cgtataccac
2521 gtgagagtca tgttagacga gactacggcg tatcaatcgt gtcggggctg tgggggggtg tggggactg
2591 cgcgggactg cccgaacaga cgagggcgt aggcgaatgt ctgttcgaca ctggcagagg cctcgcagct
2661 acacagcttc caaaagtggc agtagtggct ttgcgcgt

```

(SEC ID 154)

Figura 9

A6 scTCR-C-kappa clonado en pUC19-T7

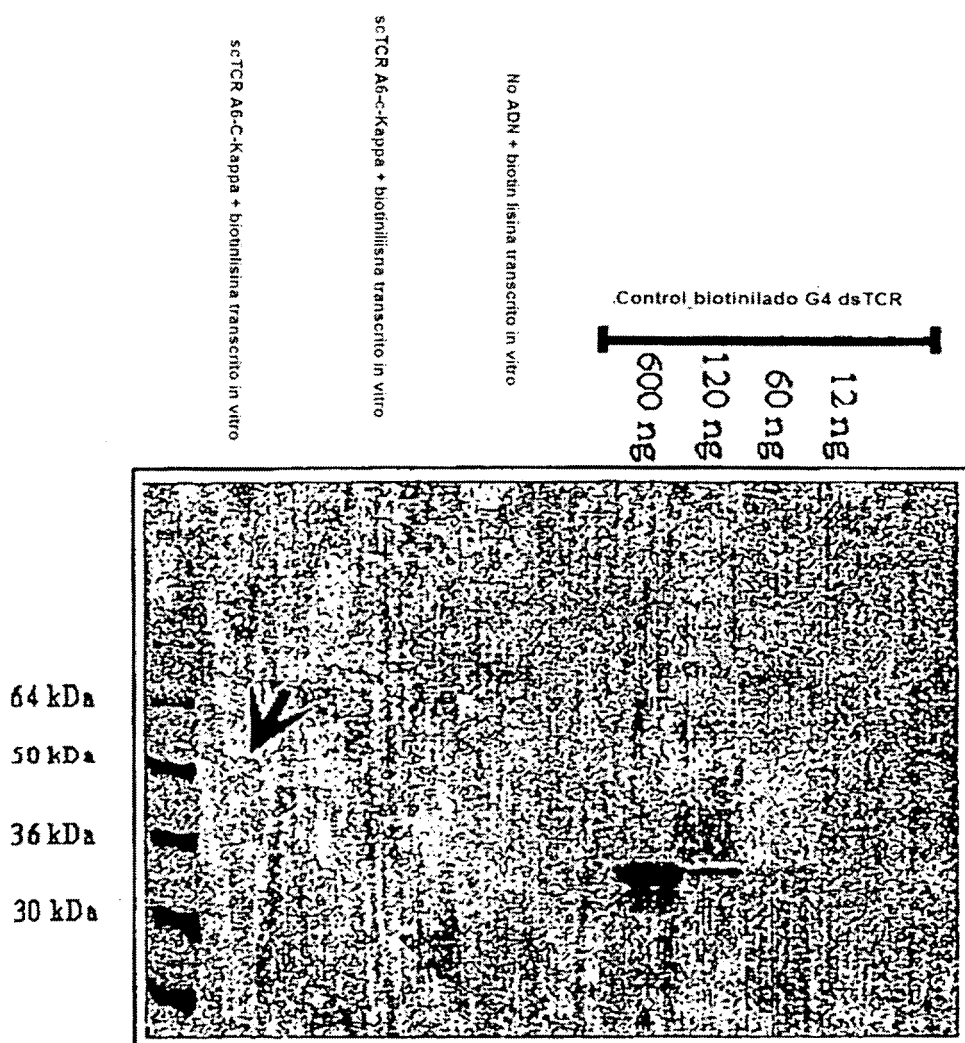
```

1  ccattgggcca gaaggaagtg gagcagaact ctggaccect cagtgttcca
51  gagggagcca ttgcctctct caactgcact tacagtgacc gaggttccca
101 gtccttcttc tggtagagac aatattcttg gaaaagccct gagttgataa
151 tgtccatata ctccaatggt gacaaagaag atggaagggt tacagcacag
201 ctcaataaag ccagccagta tgtttctctg ctcatcagag actcccagcc
251 cagtgattca gccacctacc tctgtgccgt tacaactgac agctggggga
301 aattgcagtt tggagcaggg acccaggttg tggtcaccgg tggaggcggt
351 tcaggcggag gtggatccgg cggtagcggg tcgaacgctg gtgtcactca
401 gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg aactgcagt
451 gtgcccagga tatgaacct gaatacatgt cctgggatcg acaagacca
501 ggcattggggc tgaggetgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga
551 ccaaggagaa gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg
601 atttcccgtc caggctgctg tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac
651 ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga gggcgaccag agcagtactt
701 cgggcccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa aacgtgttcc
751 cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc
801 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccagct
851 ggagctgagc tggtaggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca
901 cagacccgca gccctcaag gagcagccc cctcaatga ctccagatc
951 gctctgagca gccgcctgag ggtctcgcc acctcttggc aggacccccg
1001 caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg gagaatgacg
1051 agtggaccca ggatagggcc aaaccctca cccagatcgt cagcggcgag
1101 gcctggggta gagcagacgg tggaggcggt tcaactcagca gcacctgac
1151 gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgccaagtca
1201 cccatcaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa cccgggagag
1251 tcataagaat tc

```

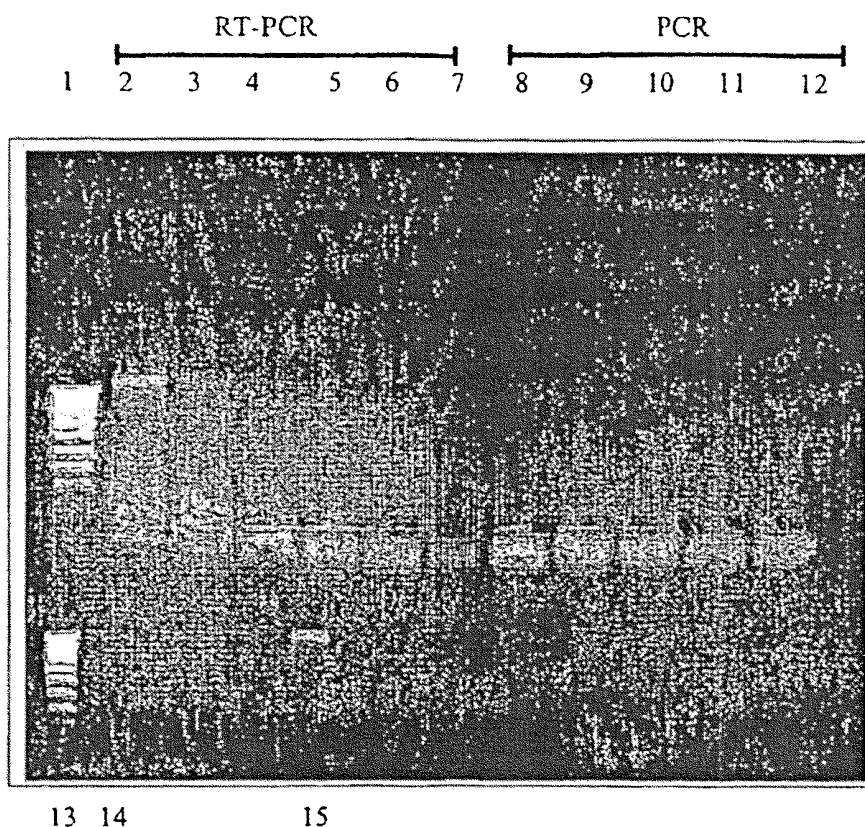
(SEC ID 155)

Figura 10



La proteína scTCR A6-C-Kappa se muestra en esta transferencia tipo western con una flecha

Figura 11



Calle 1 Marcador de ADN de 100 pb con biotina

Calle 2 Reacción de scTCR A6-C-Kappa seleccionado frente a perlas de HLA-A2 TAX

Calle 3 Reacción de scTCR A6-C-Kappa seleccionado frente a perlas de HLA-A2 TAX en presencia de 10 microgramos de scTCR A6 soluble

Calle 4 Reacción de scTCR A6-C-Kappa seleccionado frente a perlas control

Calle 5 Reacción de no ADN control seleccionado frente a perlas de HLA-A2 TAX

Calle 6 Reacción de no ADN control seleccionado frente a perlas de HLA-A2 TAX en presencia de 10 microgramos de scTCR A6 soluble

Calle 7 Reacción de no ADN control seleccionado frente a perlas control

Calles 8-12 y calle 13 son las calles 2-7 excepto que no se añadió transcriptasa inversa, sólo taq de alta fidelidad de Roche. Estos son los ADN control de contaminación

Calle 13 RT-PCR control positivo

Figure 12a

Clon 9 de la secuencia mutada de la cadena β del TCR A6

```

gctgggtgtaactcagaccccaeaattccaggctcctgaagacaggacagagcatgacactgcagtggtgccagga:algaacct
gaafacatgctcgtglatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgaltcactcagltggctggtatcactgaccaagga
gaaglccccaatggctacaatgctccagatcaaccacagaggalttcccgctcagcctgctgtggctgctcccccagacalct
gtgtacttctgtccagcaggccgggactagcgggagggtgaccagagcagtaactcgggcccgggcaaccaggctcaggtcac
agaggaccctgaaaaacgtgltcccacccgaggctcgtgltgagccalcaagaagcagagatccccacacccaaaaggcca
cactgggtgctgcccacaggcttclaccccagaccagtgaggctgagctggtggglgaalgggaaggagggtgcacagtgggg
ctgacacagaccgcagcccccaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgetctgagcagccgctgagggtctcg
ccaccctcggcaggaccccgcacaccactccgctgcaagtcaggttctacgggctctcgggagaalgacagatggaccagga
tagggccaaccggctcccagatcgtcagcggcggaggcctggggtagagcagac

```

(SEC ID 156)

Figura 12b

Clon 9 de la secuencia de aminoácidos mutada de la cadena beta de TCR A6

```

AGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPCMGLRLIHYSVGAGITDQGEVP
NGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLAGGXPEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA
LNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQVSAEAWGR
AD

```

(SEC ID 157)

X indica la posición del aminoácido correspondiente al codón de terminación “ópalo” introducido, esto normalmente tendrá como resultado la sustitución en este punto de un residuo de triptófano (w) en la cadena β del TCR

ES 2 327 229 T3

Figura 13

Clon 49 Secuencia mutada de ADN de la cadena beta del TCR A6

```
gctgggtgcaclcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacactgtagtgtgccaggatatgaacat  
gaatacatgtcctggfalcgacaagaccaggcatggggctgaggctgalfcattactcagttggtgctggatcactgaccaagga  
gaagtcccaatggctacaalgtlccagalcaaccacagaggatlcccgctcaggctgctgtcggctgtlccctcccagacatc  
tgtactctgtgccagcaggccgggaclagcgggagggcgaccagagcaglaclcgggcccggcaccagggtcacgggtcac  
agaggacctgaaaaacgtlccaccggaggtcgctgtgttgagccatcagaagcagagatclocacacccaaaaggcca  
cactgggtgcctggccacaggcttctacccgaccacgtggagctgagctggggggaatgggaaggagggtcacagtgggg  
lctgcacagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatcgcctgagcagccgcctgagggtctcgg  
ccacclctggcaggacccccgcaaccactcggctgtcaagtcagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccagga  
tagggccaaaccgltacccagatcgtcagcggcggaggcctggggtagagcagac  
(SEC ID 158)
```

ES 2 327 229 T3

Figura 14a

Clon 134 Secuencia mutada de ADN de la cadena beta del TCR A6

```
gctgggtcactcagaccccaaaattccaggctcgaagacaggacagagcatgacactgcagtggtgccaggatgaacat
gaatacatgctcggatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgaltcattactcagltgggtggtatcactgaccaagga
gaagtcccaatggctacaatgctccagatcaaccacagaggattcccgctcaggctgctgicggctgctccctcccagacatc
gtgacttctgtgcccgaggccggggctgatgagtgcggaaccagagcagacttcgggcccggccaccaggctcacggctac
agaggacctgaaaaacgltcccaccggaggtcgtgtgttgagccatcagaagcagagalctcccacaccaaaaggcca
cacgggtgctcggccaccgggttctacccgaccacgtggagctgagctgggtggggaatgggaaggagggtcacagtggggt
ctgcacagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatcgcctcagcagccgcctgagggtcicgg
ccacctctgagcaggacccccgcaaccactccgctgtcaagtcagttctacgggclctcggagaatgacgagtgaccaggga
tagggcacaaccgltcaccagatcgtcagcggcggggcctgggtagagcagactaagctgaattc
(SEC ID 159)
```

Figura 14b

Clon 134a Secuencia de aminoácidos mutada de la cadena beta del TCR A6 (BIAcore)

(Acore)

```
MNAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQG
EVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLMSAEPEQYFGPGTRLTVTEDLK
NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE
QPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA
WGRAD*
(SEC ID 160)
```

Figura 14c

Clon 134 Secuencia mutada de aminoácidos de la cadena beta del TCR A6 (ELISA)

(SA)

```
AGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVP
NGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLMSAQPEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA
LNSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGR
AD
(SEC ID 161)
```

Figura 15

Clon 134 del TCR A6

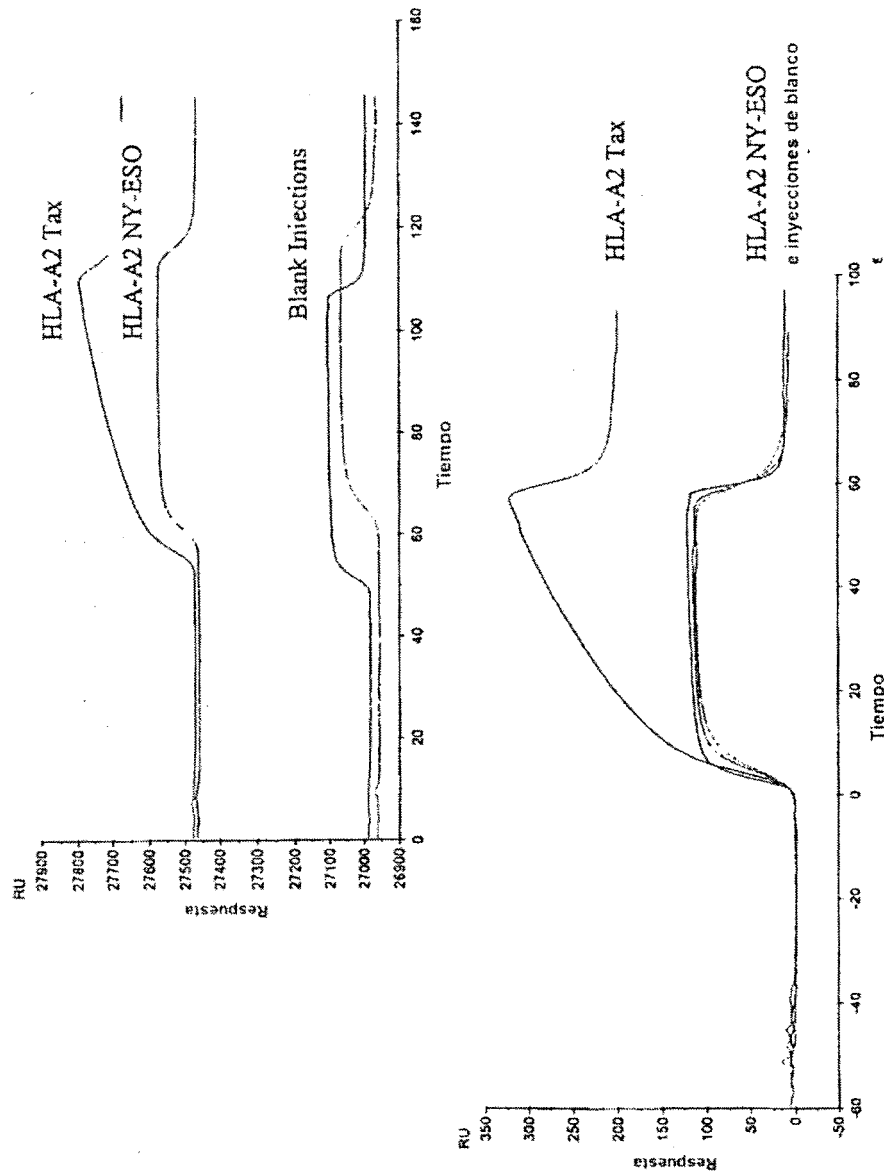
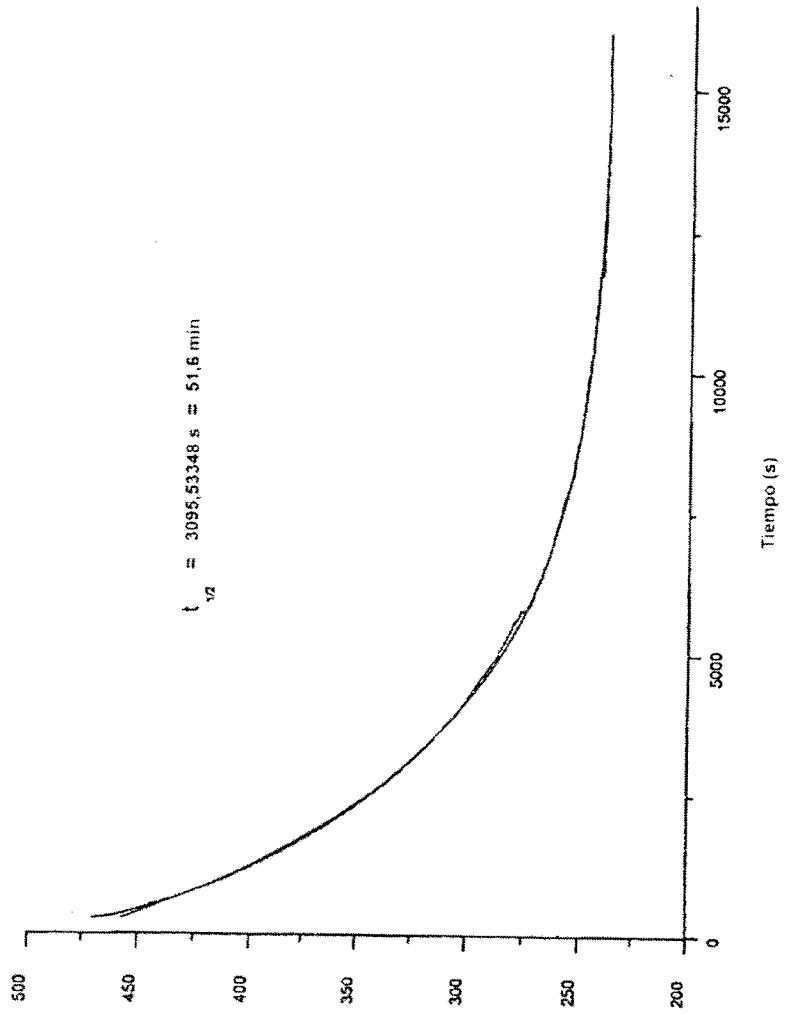


Figura 16



ES 2 327 229 T3

Figura 17a

atgcaggaggtgacacagattcctgcagctctgagtggtccagaaggagaaaacttggcttcaactgcagtttactgata
gcgctattacaaccgccagtggttaggcaggacctgggaaaggctcacatctctgttgcctattcagtcgaagtcagaga
gagcaacaagtggaaagacttaatgcctcgctggataaatcagcagcgtagtagctttatacattgcagcttccagcctgg
lgactcagccacctacctctgtgctgtagggccacatcaggaggaagctacatacctacattggaagaggaaccagcct
tattgtcatccgtatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagacttaaatccagtgacaagctgctgct
attcaccgattttgattctcaacaatgtgtcacaagtaaggattctgatgttatcacaagacaatgtgtgctagacatg
aggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaaca
gcattattccagaagacaccttctcccagcccagaaagtccaa
(SEC ID 162)

Figura 17b

atgggtgtcactcagacccccaaaatlccaggctcctgaagacaggacagagcatgacacagcagtggtgccaggatatgaa
ccatgaatcatgtcctggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcactg
accaaggagaaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgcaggtgctgctggctgctc
ctcccagacatctgtgtactctgtgcccagctacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctg
accgtactggaggacctgaaaaactgttcccaccgaggctcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatccccacacc
caaaaggccacactggtgtgctggccacaggtctcaccggaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatggggaagg
aggtgcacagtgggtctgcacagaccgcagcccccaaggagcagcccgcctcaatgactccagatagctctgag
cagccgctgagggtctggccacctctggcaggacccccgaaccactccgctgtcaagtcagttctacgggctctc
ggagaatgacgagtgaggaccaggatagggccaaaaccctcaccagatcgtcagcggcgggctgggtagagcag
actaa
(SEC ID 163)

Figura 18A

MQEV TQIP AALS VPEGEN LVLNCSFTDS AIYNLQWFRQ
DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI
AASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYI
QNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV S QSKDS
D VYITDKCVLDMRSMDFKSN S A V A WSNK SDFACANAF
NNSIIPEDTFFPSP ESS Stop
(SEC ID 164)

Figura 18b

MGV TQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFP
LRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLE
DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALS
SRLRVSATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRA
KPVTQIVSAEAWGRAD Stop (SEC ID 165)

ES 2 327 229 T3

Figura 19a

TTCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCACAC ATGTAATGTG AGTFAGCTCA
AAGGACCGGA AAACGACCGG AAAACGAGTG TACATTACAC TCAATCGAGT
CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG
GAGTAATCCG TGGGGTCCGA AATGTGAAAT ACGAAGGCCG AGCATAAAC
TGTGGAATFG TGAGCGGATA ACAA'TTTCAC ACAGGAAACA GCATAGCCA
ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTAAAGTG TGTCCTTTGT CGATACTGGT
TGATFACGCC AAGCTACGTA CTTAAGTATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA
ACTAATGCGG TTCCGATGCAT GAATTCATAA GATAAAGTTC CTCTGTCAGT
TAATGAAATA CCTATTGCCT ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCG
ATTACTTTAT GGATAACGGA TGCCGTCCGC GACCTAACAA TAATGAGCCG
GCCAGCCGG CCATGGCCAA ACAGGAGGTG ACGCAGATTC CTGCAGCTCT
CGGGTCCGGC GGTACCGGTT TGTCCTCCAC TGCGTCTAAG GACGTCCGAGA
GAGTGTCCCA GAAGGAGAAA ACTTGGTTCT CAACTGCAGT TTCACTGATA
CTCACAGGGT CTTCTCTTTT TGAACCAAGA GTTGACGTC AAGTGACTAT
CGCCTATTTA CAACCTCCAG TGGT'TTAGGC AGGACCCTGG GAAAGGTCTC
CGGATAAAT GTTGGAGGTC ACCAAATCCG TCCTGGGACC CTTTCCAGAG
ACATCTCTGT TGCTTATTCA GTCAAGTCAG AGAGAGCAAA CAAGTGGAA
TGTAGAGACA ACGAATAAGT CAGTTCAGTC TCTCTCGTTT GTTCACCTTC
ACTAATGCC TCGCTGGATA AATCATCAGG ACGTAGTACT TTATACATTG
TGAATTACGG AGCGACCTAT TTAGTAGTCC TGCATCATGA AATATGTAAC
CAGCTTCTCA GCCTGGTGAC TCAGCCACCT ACCTCTGTGC TGTGAGGCC
CTCGAAGAGT CGGACCCTG AGTCGGTGG TGGAGACAG ACACTCCGGG
ACATCAGGAG GAAGCTACAT ACCTACATTT GGAAGAGGAA CCAGCCTTAT
TGTAGTCCTC CTTCCGATGTA TGGATGTAAA CCTTCTCCTT GGTCGGAATA
TGTTCATCCG TATATCCAGA ACCCGGATCC TGCCGTGTAC CAGCTGAGAG
ACAAGTAGGC ATATAGGTCT TGGCCCTAGG ACGGCACATG GTGCACTCTC
ACTCTAAATC CAGTGACAAG TCTGTCTGCC TATTCACCGA TTTTGATTTCT
TGAGATTTAG GTCACTGTTT AGACAGACGG ATAAGTGGCT AAAACTAAGA
CAAACAAATG TGTCACAAAG TAAGGATTCT GATGTGTATA TCAACAGCAA
GTTTGTTTAC ACAGTGT'TTC ATTCTPAAGA CTACACATAT AGTGTCTGTT
ATGTGTGCTA GACATGAGGT CTATGGACTT CAAGAGCAAC AGTGTCTGTG
TACACACGAT CTGTACTCCA GATACCTGAA GTTCTCGTTG TCACGACACC
CCTGGAGCAA CAAATCTGAC TTTGCATGTG CAAACGCCCT CAACAACAGC
GGACCTCGTT GTTTAGACTG AAACGTACAC GTTTGCGGAA GTTGTGTCTG
ATTATTCCAG AAGACACCTT CTTCCTCCAG CCAGAAAGTT CCAATAAAC
TAATAAGGTC TTCTGTGGAA GAAGGGGTCC GGTCTTCAA GGATTATGG
TAGGTTAAT AAGAA'TTCT TAAGAAGGGG ATATACATAT GAAAAATTA
ATCCAATTA TTCTTAAGAA ATTCTTCCC TATATGTATA CTTTTTAAT
TTATTCGCAA TTCTTTAGT TGTTCCTTTC TATTCACACA GCGCGCAGG
ATAAGCGTT AAGGAAATCA ACAAGGAAAG ATAAGAGTGT CGCGCTCCG
TGGTGTACT CAGACCCCAA AATTCCAGGT CCTGAAGACA GGACAGAGCA
ACCACAGTGA GTCTGGGGTT TTAAGGTCCA GGACTTCTGT CCTGTCTGT
TGACACTGCA GTGTGCCAG GATATGAACC ATGAATACAT GTCCTGGTAT
ACTGTGACGT CACACGGGTC CTATACTTGG TACTTATGTA CAGGACCATA
CGACAAGACC CAGGCATGGG GCTGAGGCTG ATTCATTA CTAGTCTGTC
TGTGTCTCG GTCCGTACCC GACTCCGAC TAAGTAATGA GTCACCACG
TGTATCACT GACCAAGGAG AAGTCCCCAA TGGCTACAA GTCTCCAGAT
ACCATAGTGA CTGTTTCCCT TTCAGGGGTT ACCGATGTTA CAGAGTCTA
CAACCACAGA GGA'TTCCCG CTCAGGCTGC TGTCCGCTGC TCCCTCCAG
GTTGGTGTCT CCTAAAGGGC GAGTCCGACG ACAGCCGACG AGGGAGGGT
ACATCTGTGT ACTTCTGTGC CAGCAGTTAC GTCGGGAACA CCGGGAGCT
TGTAGACACA TGAAGACACG GTCGTCAATG CAGCCCTTGT GCGCCCTCGA
GTTTTTTGGA GAAGGCTCTA GGCTGACCGT ACTGGAGGAC CTGAAAAACG
CAAAAAACCT CTTCCGAGAT CCGACTGGCA TGACCTCCTG GACTTTTTCG
TGTTCACC ACCAGGTCGCT GTGTTTGAGC CATCAGAAGC AGAGATCTCC
ACAAGGTTGG GCTCCAGCGA CACAAACTCG GTAGTCTTCG TCTCTAGAGG
CACACCCAAA AGGCCACACT GGTGTGCCCT GCCACAGGCT TCTACCCCGA
GTGTGGGTTT TCCGGTGTGA CCACACGGAC CCGTGTCCGA AGATGGGGCT
CCACGTGGAG CTGAGCTGGT GGGTGAATGG GAAGGAGGTG CACAGTGGGG
GGTGCACCTC GACTCGACCA CCCACTTACC CTTCTCCAC GTGTACCC
TCTGCACAGA CCCGACGCC CTC AAGGAGC AGCCCGCCCT CAATGACTCC
AGACGTGTCT GGGCGTCGGG GAGTTCCTCG TCGGGCGGGA GTTACTGAGG
AGATACGCTC TGAGCAGCCG CCTGAGGGTC TCGGCCACCT TCTGGCAGGA
TCTATGCGAG ACTCGTCCGC GGACTCCAG AGCCGGTGGG AGACCGTCT
CCCCGCAAC CACTTCGGCT GTC AAGTCCA GTTCTACGGG CTCTCGGAGA
GGGGCGTGTG GTGAAGGCGA CAGTTCAGGT CAAGATGCCC GAGAGCCTCT
ATGACGAGTG GACCCAGGAT ACGGCCAAAC CCGTCACCCA GATCGTACG
TACTGCTCAC CTGGTCCCTA TCCCGT'TTG GGCAGTGGGT CTAGCAGTCC
GCCGAGGCTT GGGGTAGAGC AGACCGGGCC GCA
CGGCTCCGGA CCCCATCTCG TCTGCGCCGG CGT

(SEC ID 166)

Figura 19b

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

(SEC ID 167)

Figura 20

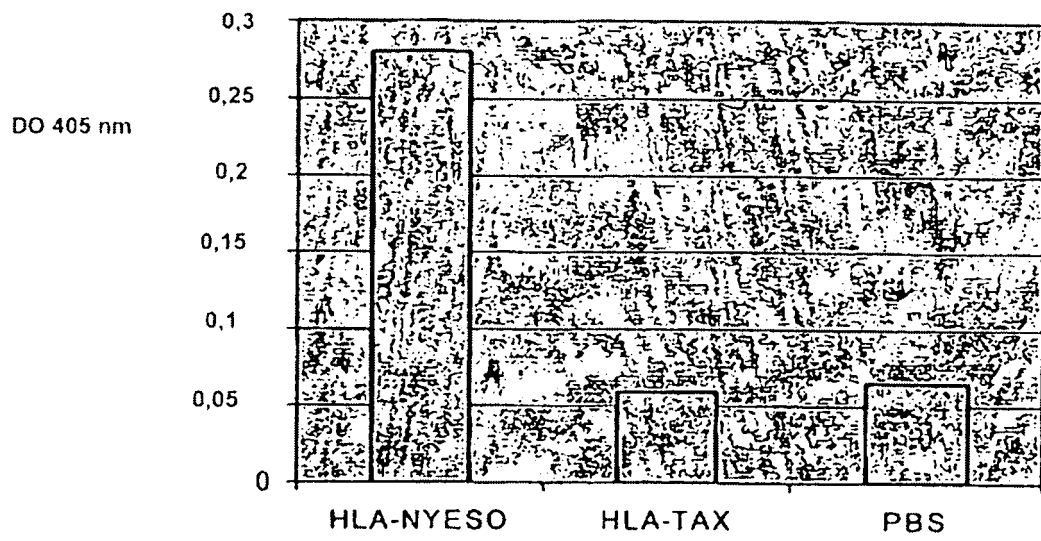


Figura 21

DRA0101

```

1 ggatccatgg ccataagtg agtccctgtg ctaggatctt taccatbqg tbtgtctgag
61 agcgtccagg aatcatggtc tatecaagaa gnaacatgtg bentccagge agagtccat
121 ctgactcctg acccaacagg caggtttctg ttgactctg abggtgatga gatttccat
191 gtgcatctg caacgaagga gaggphctg cggcttgaag aattctgagc atttccagg
241 ttgaggctc aaggtgctt gcccacata qctgtggcc aagcaccct ggaalcatg
391 ccaagcctt ccaactatc tccgatctc satgtacctc cagaggtaac tgtctcagc
361 ccagcctt tggtaactg agagcccaac gtcctcctc gtcctcctc cagttctcc
471 ccaaccctg tcaatgctt gttgtctga aatggaaac ctctcaccac agagctctc
491 aagatctt tccctccac ggaacaccac ctctccagc agtccctc tctccctc
541 ctgctctca ctgagcctt ctatgctctc aaggtgagc actgggctt ggtgagctt
601 ctctcacc actgagctt tcatgctca agcctctcc cagagctcc agagctctc
641 actgagctt tcatgctca agcctctcc cagagctcc agagctctc
721 actgagctt tcatgctca agcctctcc cagagctcc agagctctc
781 actgagctt tcatgctca agcctctcc cagagctcc agagctctc
841 actgagctt tcatgctca agcctctcc cagagctcc agagctctc

```

(SEC ID 168)



- Codones de cremallera Fos leucina
- Codones de indicador de biotimidilación

Figura 22

```

1 aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga gataagattg
61 aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcggt ggcacaacta tttacaatgc ggccaagtta
121 taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcy gcccgagttg tttgcygtacg
181 tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac cctagttattg
241 gagcaataat cgatttaacc aacacgtcta aatattatga tgggtgtgat tttttgcggg
301 cgggectgtt atacaaaaaa attcaagtac ctggccagac tttgccgcct gaaagcatag
361 ttcaagaatt tattgacacg gtaaaagaat ttacagaaaa gtgtcccggc atgttgggtgg
421 gcgtgcaact cacacacggt attaategca ccggttacat ggtgtgcaga tatttaatgc
481 acaccctggg tattgcyccg caggaagcca tagatagatt cgaaaaagcc agaggtcaca
541 aaattgaaag acaaaattac gttcaagatt tattaattta attaatatta tttgcattct
601 ttaacaaata ctttatccca ttttcaaat gttgcgcttc tccagcgaa ccaaaactat
661 gcttcgcttg ctccgcttag ctgtgagcgt atcagtggcg ttgttccaat cgacggtagg
721 attagccgg atattctcca ccacaatggt ggcaacgttg atgttacgtt tatgcttttg
781 gttttccacg tacgtctttt ggccggtaat agccgtaaac gtagtccgtt cgcgcgtcac
841 gcacaacacc ggatgtttgc gcttgcgcgc ggggtattga accgcgcgat ccgacaaatc
901 caccactttg gcaactaaat cggtgaccct cgcgtctttt ttctgcatta tttcgtcttt
961 cttttgcatg gtttccctga agccggtgta catgcggttt agatcagtea tgacgcgcgt
1021 gacctgcaaa tctttggcct cgatctgctt gtccttgatg gcaacgatgc gttcaataaa
1081 ctcttgtttt ltaacaagtt cctcggtttt ttgcgcacc accgcttgca gcgcgcttgt
1141 gtgctcggtg aatgtcgcaa tcagcttagt caccaactgt ttgctctctt cctcccgttg
1201 tttgatcgcg ggatcgtact tgcgggtgca gagcacttga ggaattactt cttctaaaag
1261 ccattcttgt aattctatgg cgtaaggcaa tttggacttc ataactagct gaatcacgcc
1321 ggatttagta atgagcactg tatgcggctg caaatacagc gggtcgcccc ttttcacgac
1381 gctgttagag gtagggcccc cttttggat ggtctgctca aataacgat ttgatttatt
1441 gtctacatga acacgtatag ctttatcaca aactgtatat tttaaactgt tagcgactc
1501 cttggccacg aaccggacct gttggtcgcg ctctagcacg taccgcaggt tgaacgtatc
1561 ttctccaaat ttaaattctc caattttaac gcgagccatt ttgatcacg tgtgtcgatt
1621 ttgcaacaac tattgttttt taacgcaaac taaacttatt gtggtaaagca ataattaaat
1681 atgggggaaac atgcgcgcgt acaacactgc tegtattgaa cgcagacggc gccggctctg
1741 gcgcaagcgg ctaaaaacgtg ttgcgccttc aacgcggcaa acatcgcaaa agccaatagt
1801 acagttttga tttgcatatt aacggcgatt ttttaatta tcttatttaa taaatagtta
1861 tgacgcctac aactccccgc ccgcgttgac tegtgcacc tgcagcagtt cgttgacgcc
1921 ttctcctcgt tggccgaaca cgtcgcgcgg gtggtcgatg accagcggcg tgccgcacgc
1981 gacgcacaag tatctgtaca ccgaatgatc gtcgggcgaa ggcagctcgg cctccaagtg
2041 gcaattattg caaattcgaa aatatataca gttgggtgtt ttgcgcata ctactgtggc
2101 gttgggcatg tacgtcgaa cgttgatttg catgcaagcc gaaattaaat cattcagatt
2161 agtgcgatta aaacgttgta cctcctcgtt ttaatcatg ccgtcgatta aatcgcgcaa
2221 tgcagtcagg tgatcaaagt gtggaataat gttttctttg tattcccag tcaagcgcag
2281 cgcgtatttt acaaaactag ccatcttgta agttagtctt atttaatgca actttatcca
2341 ataatatatt atgtatcgca cgtcaagaat taacaatgcy cccgttgctc catctcaaca
2401 cgactatgat agagatcaaa taaagcgcga attaaatagc ttgcgacgca acgtgcacga
2461 tctgtgcacg cgttccggca cgagctttga ttgtaataag tttttacgaa gcgatgacat
2521 gaccccgcta gtgacaacga tcacgcccc aagaactgcc gactacaaaa ttaccgagta
2581 tgcgggtgac gttaaaacta ttaagccatc caatcgaccg ttagtccaat caggaccgct
2641 ggtgcgagaa gccgcgaagt atggcgaatg catcgtataa cgtgtggagt ccgctcatta
2701 gagcgtcatg tttagacaag aaagctacat atttaattga tcccgatgat tttattgata
2761 aattgacct aactccatc acggtattct acaatggcgg ggttttggtc aaaaattccg
2821 gactgcgatt gtacatgctg ttaacggctc cgeccactat taatgaaatt aaaaattcca
2881 attttaaaaa acgcagcaag agaaacattt gtatgaaaga atgcgtagaa ggaagaaaa
2941 atgtcgtcga catgctgaac aacaagatta atatgcctcc gtgtataaaa aaaatattga
3001 acgatttgaa agaaaaaat gtaccgcgcg gcggtatgta caggaagagg tttatactaa
3061 actgttacat tgcaaacgtg gtttcgctgt ccaagtgatg aaaccgatgt ttaatcaagg
3121 ctctgacgca tttctacaac caccactcca agtgtgtggg tgaagtcagt catcttttaa
3181 tcaaatccca agatgtgtat aaaccaccaa actgccaaaa aatgaaaact gtcgacaagc

```

ES 2 327 229 T3

3241 tctgtccggt tgctggcaac tgcaagggtc tcaatcctat ttgtaattat tgaataataa
 3301 aacaattata aatgctaaat ttgtttttta ttaacgatac aaaccaaacg caacaagaac
 3361 atttgtagta ttatctataa ttgaaaacgc gtagttataa tcgctgaggt aatattttaa
 3421 atcattttca aatgattcac agttaatttg cgacaatata attttatttt cacataaact
 3481 agacgccttg tcgtcttctt ctctcgatcc ctctctcttt tcatttttct cctcataaaa
 3541 attaacatag ttattatcgt atccatataat gtatctatcg tatagagtaa attttttggt
 3601 gtcataaata tatatgtctt ttttaatggg gtgtatagta ccgctgcgca tagtttttct
 3661 gtaatttaca acagtgtctat tttctggtag ttcttcggag tgtgttgctt taattattaa
 3721 atttatataa tcaatgaatt tgggatcgtc ggttttgtag aatatgttgc cggcatagta
 3781 cgcagcttct tctagttcaa ttacaccatt ttttagcagc accggattaa cataactttc
 3841 caaaatgttg tacgaaccgt taaacaaaaa cagttcacct cccttttcta tactattgtc
 3901 tgcgagcagt tgtttgttgt taaaaaaac agccattgta atgagacgca caaataaata
 3961 tcacaaactg gaaatgtcta tcaatatata gttgctgatg atccagcatg ataagataca
 4021 ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa
 4081 tttgtgatgc tattgtctta tttgtaacca ttataagctg caataaaciaa gttccgagtt
 4141 tgtcagaagag cagaccaaac agcgggttga ataatagcga gaacagagaa atagcggcaa
 4201 aataaatacc cgtatcactt ttgctgatat ggttgatgtc atgtagccaa atcgggaaaa
 4261 acgggaagta ggctcccatg ataaaaaagt aaaagaaaaa gaataaacgg aacatccaaa
 4321 agtttgtgtt ttttaaatag tacataatgg atttccttac gcgaaatagc ggcagacatg
 4381 gcctgcccgg ttattattat ttttgacacc agaccaactg gtaatggtag cgaccggcgc
 4441 tcagctggaa ttcagatctg tgattgtaaa taaaatgtaa tttacagtat agtattttaa
 4501 ttaatatata aatgatttga taataattct tatttaacta taatatattg tgttggggtg
 4561 aattaaaggt cccggcatcc tcaaatgcat aatttcatag tccccctgtg tghtaagtgt
 4621 gegtatttct gaatctttgt aaaaatagcac acaagactcc aacgcgtttg cgtttttatt
 4681 ttctgtctcg actctagttt attaggcctc tagagatccg ttttatagg tttttttatt
 4741 acaaaactgt tacgaaaaca gtaaaatact tttttattg cgagatggtt atcattttaa
 4801 ttatctccat gatccaataa acctagaata aagggccga cctttaattc aacccaacac
 4861 aatatattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat taaaatacta
 4921 tactgtaaat tacattttat ttacaatcac agatcccggg gatccgggta ttagtacatt
 4981 tattaagcgc tagattctgt gcggttgtga tttacagaca attggtgtac gtattttaat
 5041 aattcattaa atttataatc tttagggtgg tatgttagag cgaaaatcaa atgattttca
 5101 gcgtctttat atctgaattt aaatatttaa tctcaatag atttgtaaaa taggtttcga
 5161 ttagtttcaa acaaggggtg tttttccgaa ccgatggctg gactatctaa tggattttcg
 5221 ctcaacgcca caaaactgc caaatctgt agcagcaatc tagctttgtc gatattctgt
 5281 ttggttttgt tttgtaataa aggttcgacg tctgtcaaaa tattatgctc ttttgtattt
 5341 ctttcatcac tgtcgttagt gtacaattga ctgcagtaa acacgttaa taaagcttgg
 5401 acatatttaa catcggcgtt gttagcttta ttaggccgat tctcgtctc gtcccaacc
 5461 tcgtcgttag aagttgcttc cgaagacgat tttgccatag ccacacgacg cctattaatt
 5521 gtgtcggcta acacgtccgc gatcaaattt gtagttagc tttttggaat ttttctgat
 5581 tgcgggcgtt tttggcggg tttcaatcta actgtgccg attttaattc agacaacacg
 5641 ttagaaaagc atggtgcagg cgggtgtaac atttcagacg gcaaatctac taatggcggc
 5701 ggtggtggag ctgatgataa atctaccatc ggtggaggcg caggcggggc tggcggcgga
 5761 ggcggaggcg gaggtggtgg cgggtgatgca gacggcgggt taggctcaaa tgtctcttta
 5821 ggcaacacag tcggcacctc aactattgta ctggtttcgg gcgcccgttt tggtttgacc
 5881 ggtctgagac gagtgcgatt tttttcgttt ctaatagctt ccaacaattg ttgtctgtcg
 5941 tctaaaggtg cagcgggttg aggttcgctc ggcattggtg gagcggggcg caattcgacg
 6001 atcgatgggt gtggtggtgg tggaggcct ggaatgtag gcaacgggag aggtggtggc
 6061 ggcggtgccc cgggtataat ttgttctggt ttagtttgtt cgcgcacgat tgtgggcacc
 6121 ggcgaggcg cgcgtggctg cacaacggaa ggtcgtctgc ttcgaggcag cgcttggggt
 6181 ggtggcaatt caatattata attggaatc aaatcgtaaa aatctgctat aagcattgta
 6241 atttcgctat cgtttaccgt gccgatattt aacaaccgct caatgtaagc aattgtattg
 6301 taaagagatt gtctcaagct cggatcagc cgcacgccc ataacaagc ttttctttt
 6361 tactacagca ttgtagtggc gagacacttc gctgtcgtcg acgtacatgt atgtttgtt
 6421 gtcaaaaacg tcggtggcaa gctttaaaat atttaaaaga acatctctgt tcagcaccac
 6481 tgtgtgtgct taaatgttgt ttttgataat ttgcgcttcc gcagtatcga cacgttcaaa

ES 2 327 229 T3

6541 aaattgatgc gcatcaatth tgttgttcct attattgaat aaataagatt gtacagattc
 6601 atatctacga ttcgtcatgg ccaccacaaa tgctacgctg caaacgctgg tacaatttta
 6661 cgaaaactgc aaaaacgtca aaactcggta taaaataatc aacgggcgct ttggcaaaat
 6721 atctatttta tcgcacaagc ccactagcaa attgtatttg cagaaaacaa ttctggcgca
 6781 caattttaac gctgacgaaa taaaagtcca ccagttaatg agcgaccacc caaattttat
 6841 aaaaatctat tttaatcacg gttccatcaa caaccaagtg atcgtgatgg actacattga
 6901 ctgtcccgat ttatttgaaa cactacaaat taaagggcag cttctgtacc aacttgtag
 6961 caatattatt agacagctgt gtgaagcgtc caacgatttg cacaagcaca atttcataca
 7021 caacgacata aaactcgaia atgtcttata tttcgaagca cttgatcggg tgatgtttg
 7081 cgattacgga ttgtgcaaac acgaaaactc acttagcgtg cacgacggca cgttgaggta
 7141 ttttatttcg gaaaaaatlc gacacacaac tatgcacglt tegtttgact ggtccagtc
 7201 gtgttaacat acaagttgct aaccggcggc cgacacccat ttgaaaaaag cgaagacgaa
 7261 atgttggaat tgaatagcat gaagcgtcgt cagcaataca atgacattgg cgttttaaaa
 7321 caggttcgta acgtaaacgc tcgtgacttt gtgtactgcc taacaagata caacatagat
 7381 tgtagactca caaattacaa acaaattata aaacatgagt ttttgcgta aaaaagccac
 7441 ttgttttacg agtagaatlc ccagcttggc actggccgctc gttttacaa gtctgtactg
 7501 ggaaaaccct ggccgttacc cacttaactc ccttgcagca catccccct tcgccaagtc
 7561 gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca cctgaaatgg
 7621 cgaatggcgc ctgatgcggg attttctcct tacgcatctg tgcggatatt cacaccgcat
 7681 atgggtgact ctacgtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacacc
 7741 gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca
 7801 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg
 7861 cgcggacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg
 7921 gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaaaccc
 7981 ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt
 8041 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttatccc
 8101 tttttgcgg cattttgctt tcctgttttt gctcaccagc aaacgctggg gaaagtàaaa
 8161 gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg
 8221 aagatccttg agagttttcg ccccgaaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt
 8281 ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgcggggc aagagcaact cggtcgccc
 8341 atacactatt ctacagaatga cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg
 8401 gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg
 8461 gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgacaaac
 8521 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaaatga agccatacca
 8581 aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta
 8641 actggcgaac tacttactct agcttcccgt caacaattaa tagactggat taggcccgat
 8701 aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgcgtataaa
 8761 tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag
 8821 cctcccgtta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat
 8881 agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt
 8941 tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg
 9001 aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccctaac gtgagttttc gttccactga
 9061 ggtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgctga
 9121 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa
 9181 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaact
 9241 gtctctctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgctaca
 9301 tacctcgcctc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt
 9361 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggctggg ctgaacgggg
 9421 ggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag
 9481 cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta
 9541 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat
 9601 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg
 9661 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc
 9721 ttttctggtc cttttgetca catgttcttt cctgcgttat cccctgatlc tgtggataac
 9781 cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc
 9841 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgc aaccgctct ccccgcgct
 9901 tggccgattc ataatgcag ctggcaccgac aggtttccc actggaaagc gggcagtgag
 9961 cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccaggcttt acactttatg

ES 2 327 229 T3

```
10021 cttccggctc gtatggttg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc  
10081 tatgaccatg attacg
```

(SEC ID 169)



- Sitios de enzimas de restricción

Figura 23

```

1 ggtaccggat ccagcatggt gtgtctgaag ctccttgag gctcctgcat gacagcgtg
61 acagtgaac tgatggtgct gagctcccca ctggctttgt cgggagacac cggacctaag
121 tacgtcaagc agaacacact gaaactggct tccggtggcg gatctctagt tccacgcggg
181 agtggagggc gtggttccgg agacacgcgt ccacgtttct tgtggcagct taagttgaa
241 tgtcatttct tcaatgggac ggagcgggtg cggttgctgg aaagatgcat ctataaccaa
301 gaggagtccg tgcgcttcga cagcgcgtg ggggagtacc gggcggtgac ggagctgggg
361 cggcctgatg ccgagtactg gaacagccag aaggacctcc tggagcagag gcgggcccgcg
421 gtggacacct actgcagaca caactacggg gttggtgaga gcttcacagt gcagcggcga
481 gttgagccta aggtgactgt gtatcctca aagaccagc cctgcagca ccacaacctc
541 ctggtctgct ctgtgagtgg tttctatcca ggcagattg aagtcaggtg gtcccgaac
601 ggccaggaag agaaggctgg gttggtgtcc acaggcctga tccagaatgg agattggacc
661 tccagacacc tggatgatgt ggaaacagtt cctcggagtg gagaggttta cacctgcca
721 gtggagcacc caagtgtgac gagcctctc acagtggaat ggagagcacg gctggaatc
781 gcacagagca aggtcgacgg aggcgggtggg ggtagaatcg cccggtgga ggaaaagtg
841 aaaacttga aagctcagaa ctcggagctg gcgtccacgg ccaacatgct cagggaaacg
901 gtggcacagc ttaaacagaa agtcatgaac tactaggatc c

```

(SEC ID 170)

XXX
XXX

- Codones de cremallera de Jun leucina
- Péptido cargado con HLA

Figura 24

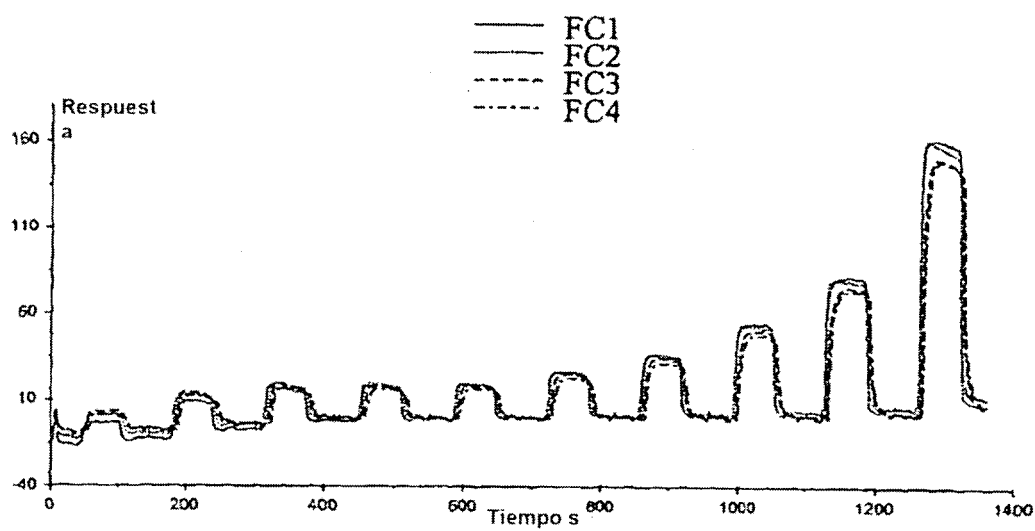


Figura 25

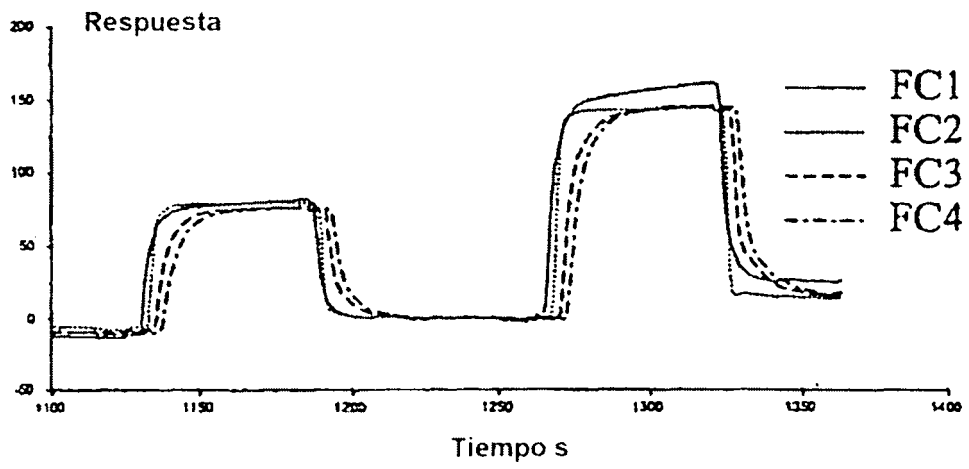


Figura 26

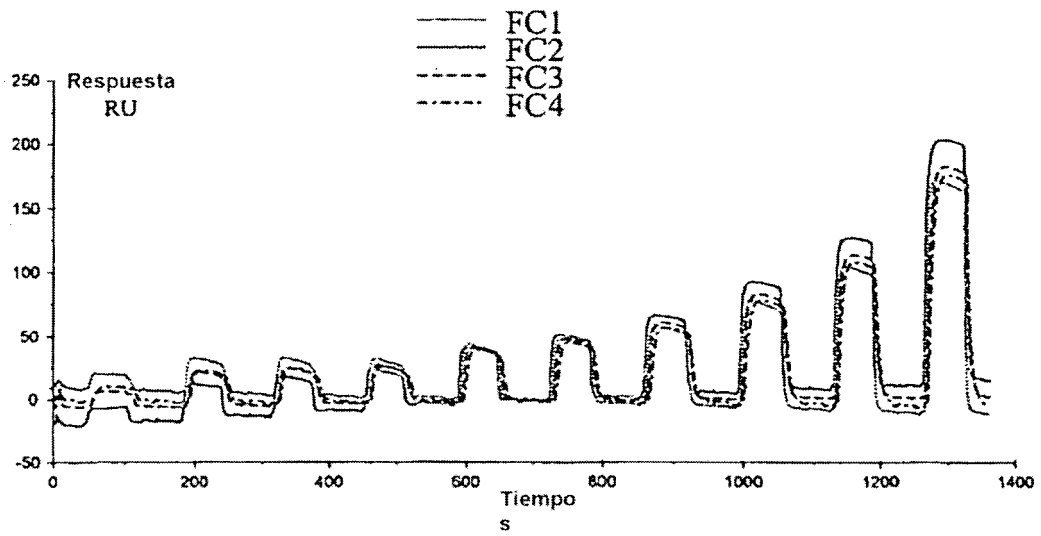


Figura 27

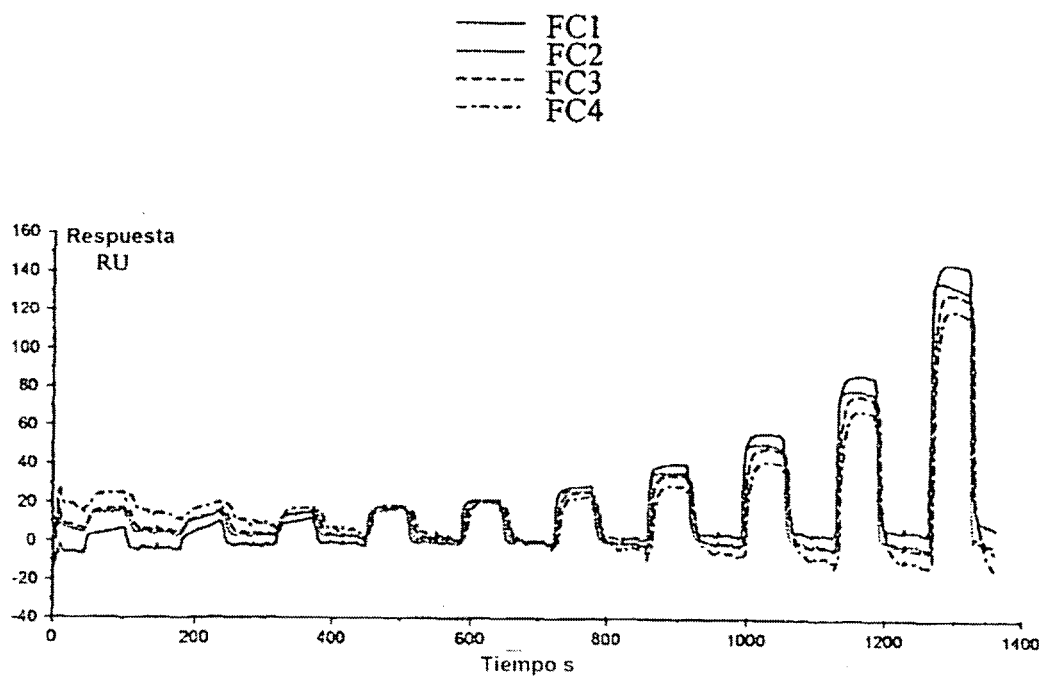


Figura 28

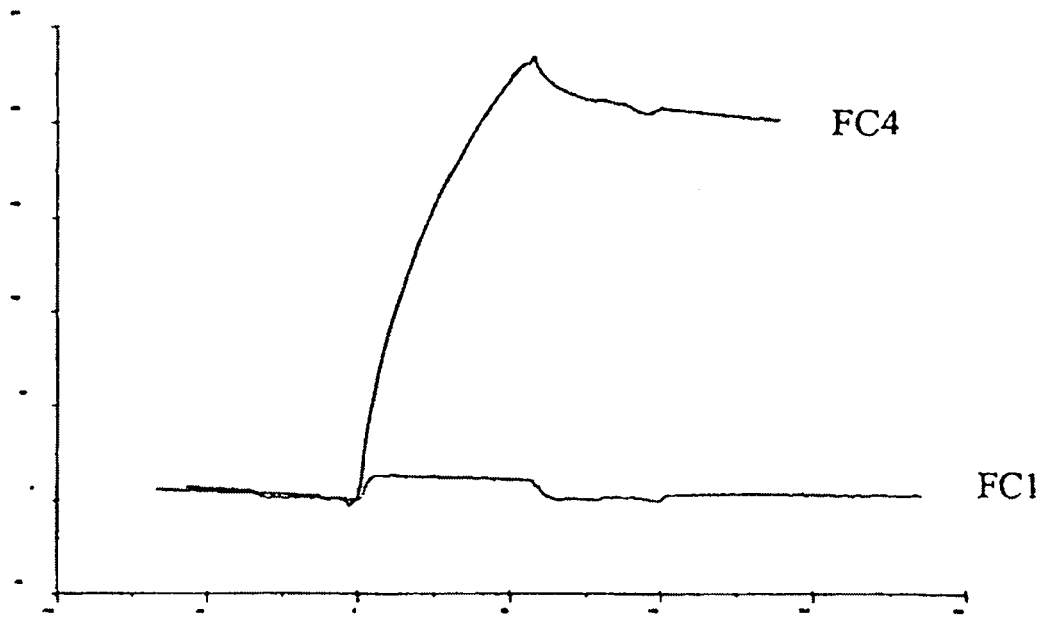


Figura 29a

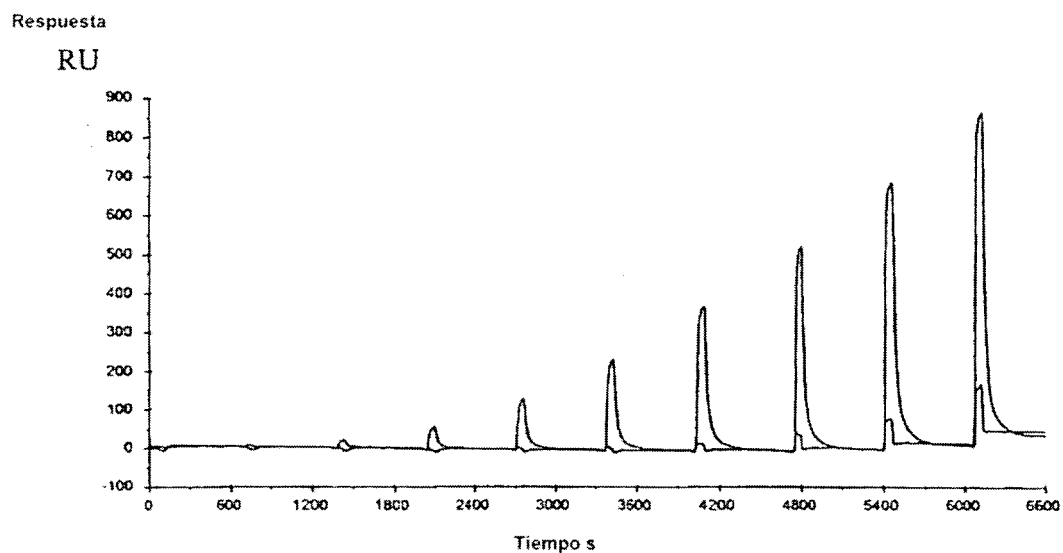


Figura 29b

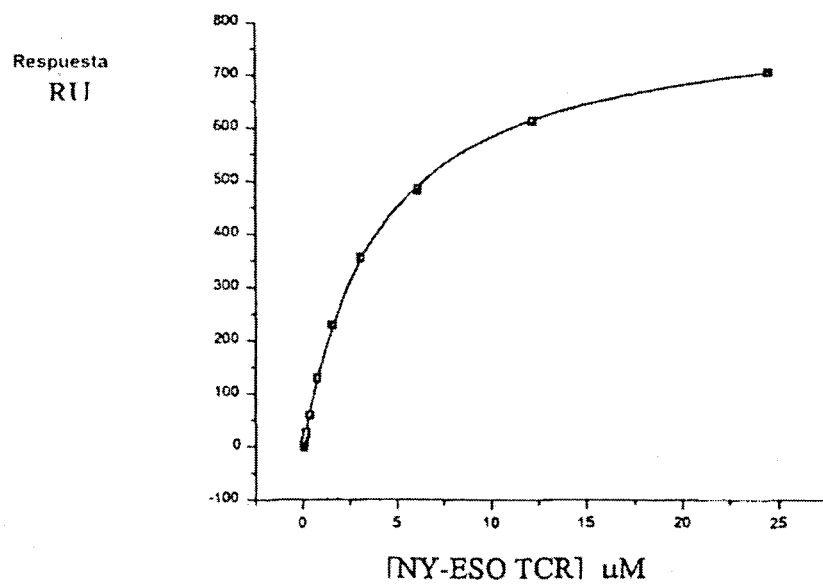


Figura 30a

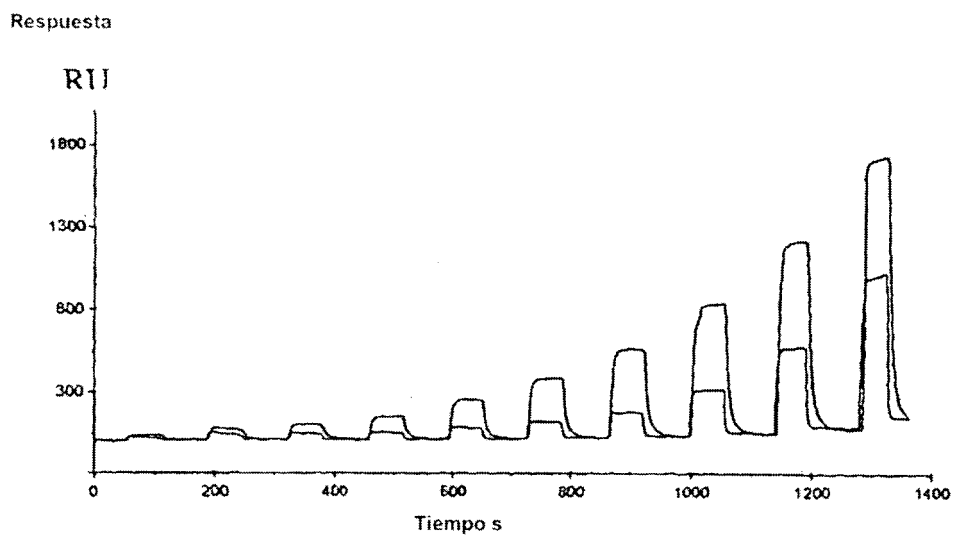


Figura 30b

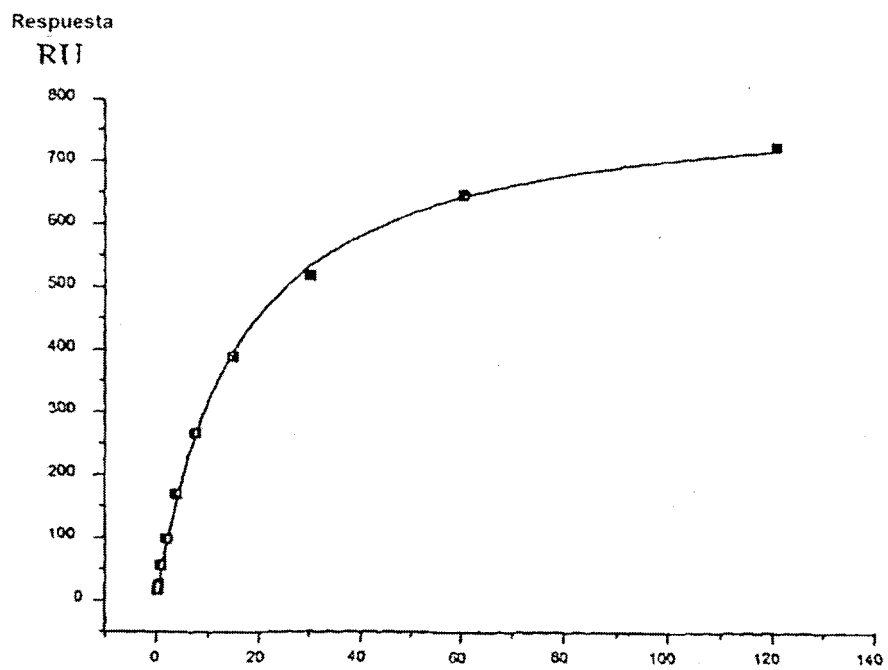


Figura 31a

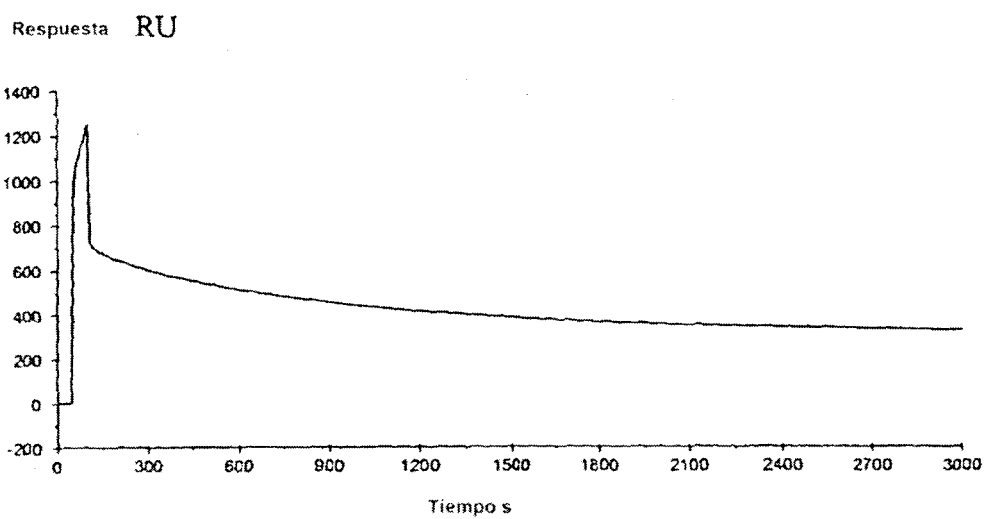


Figura 31b

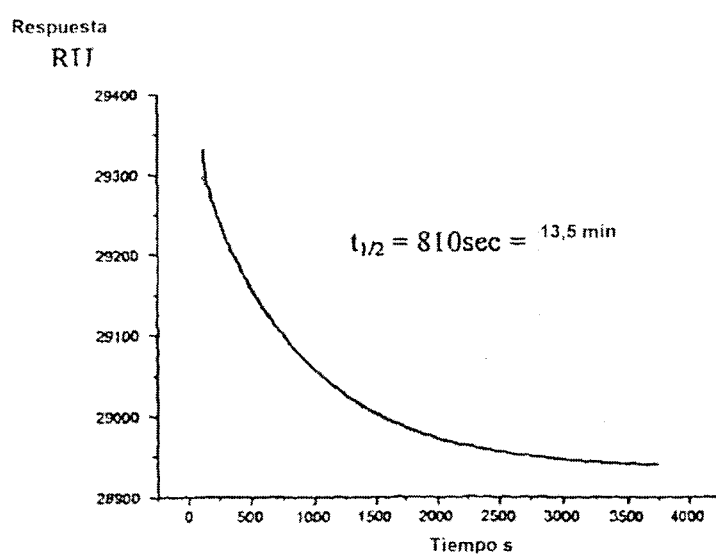


Figura 32a

Respuesta RU

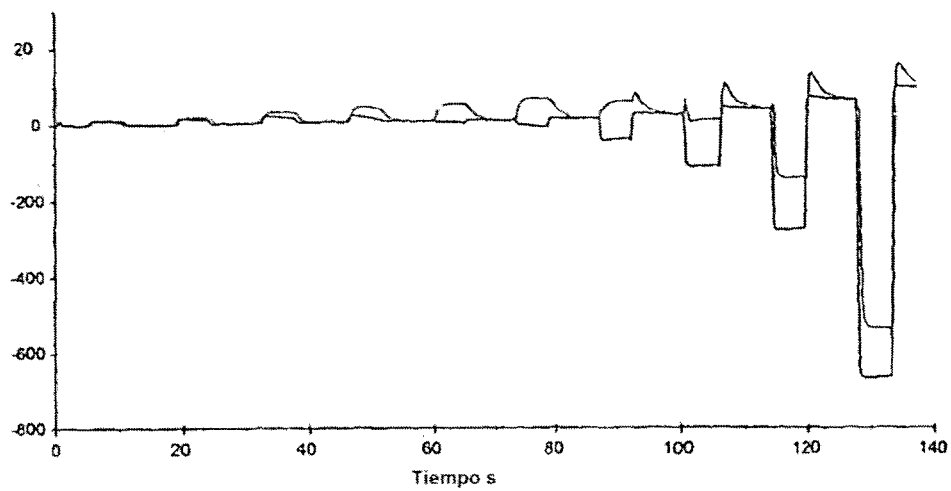


Figura 32b

Respuesta
RU

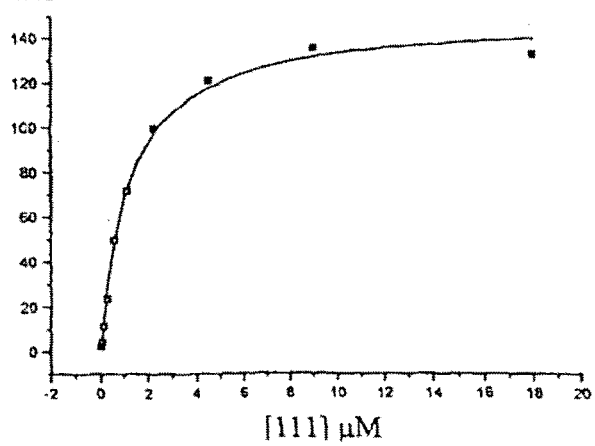


Figura 33a

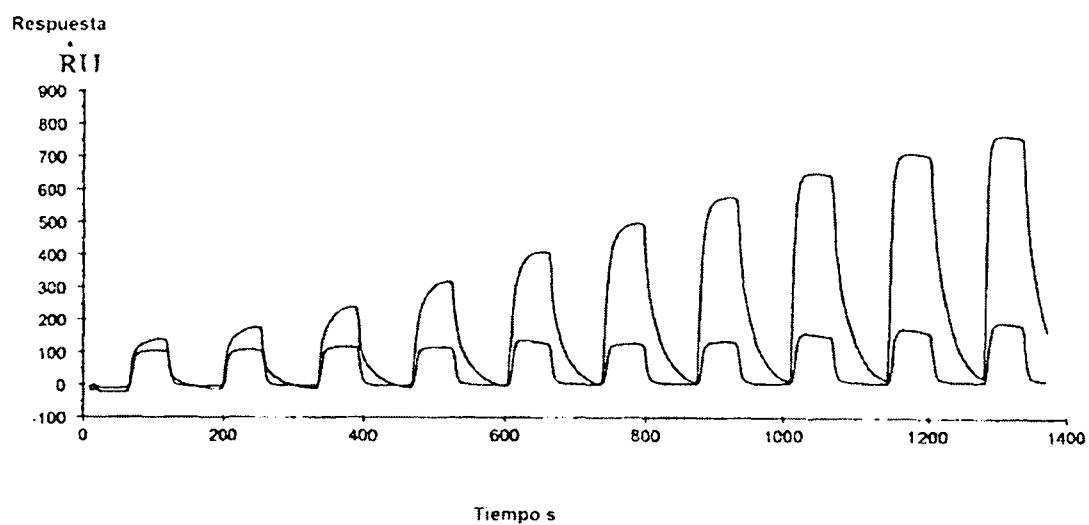


Figura 33b

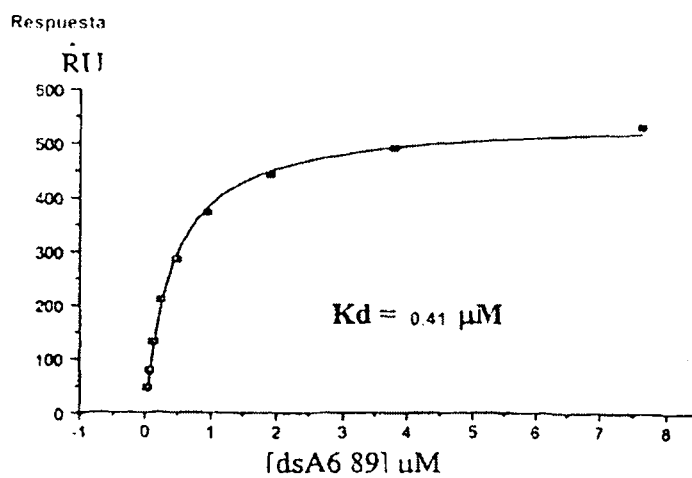


Figura 34

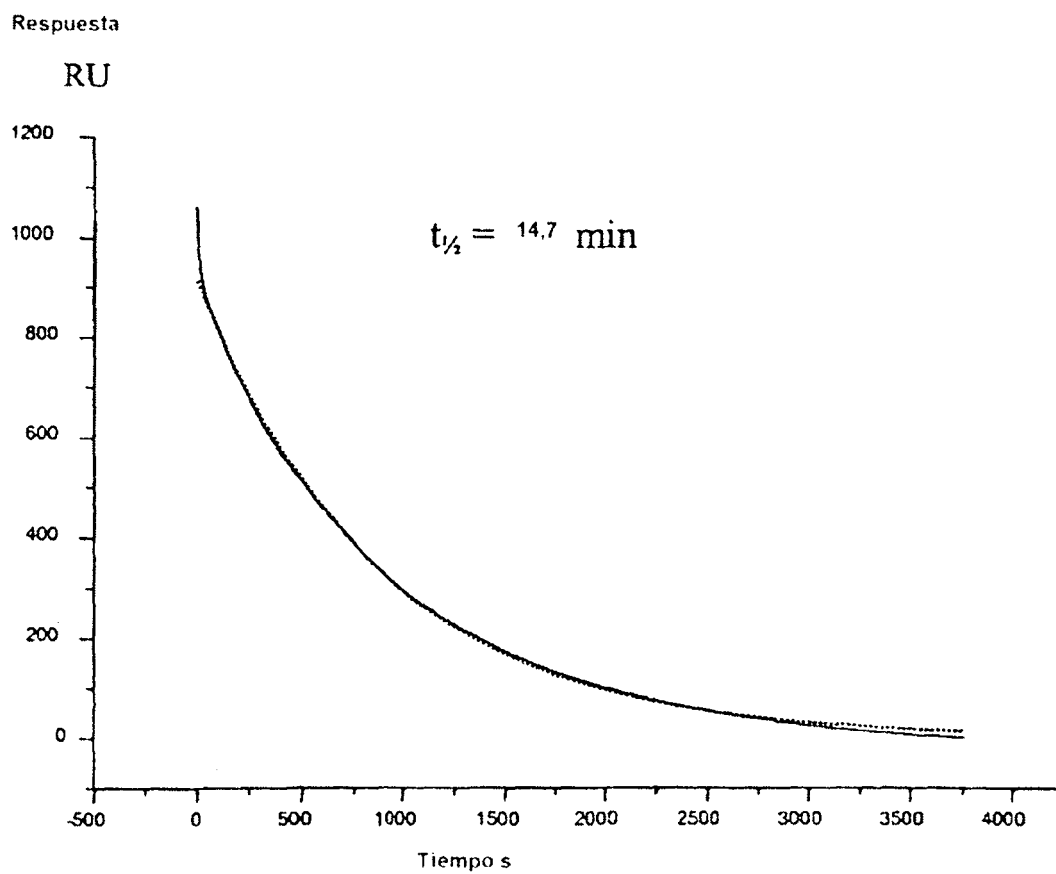


Figura 35

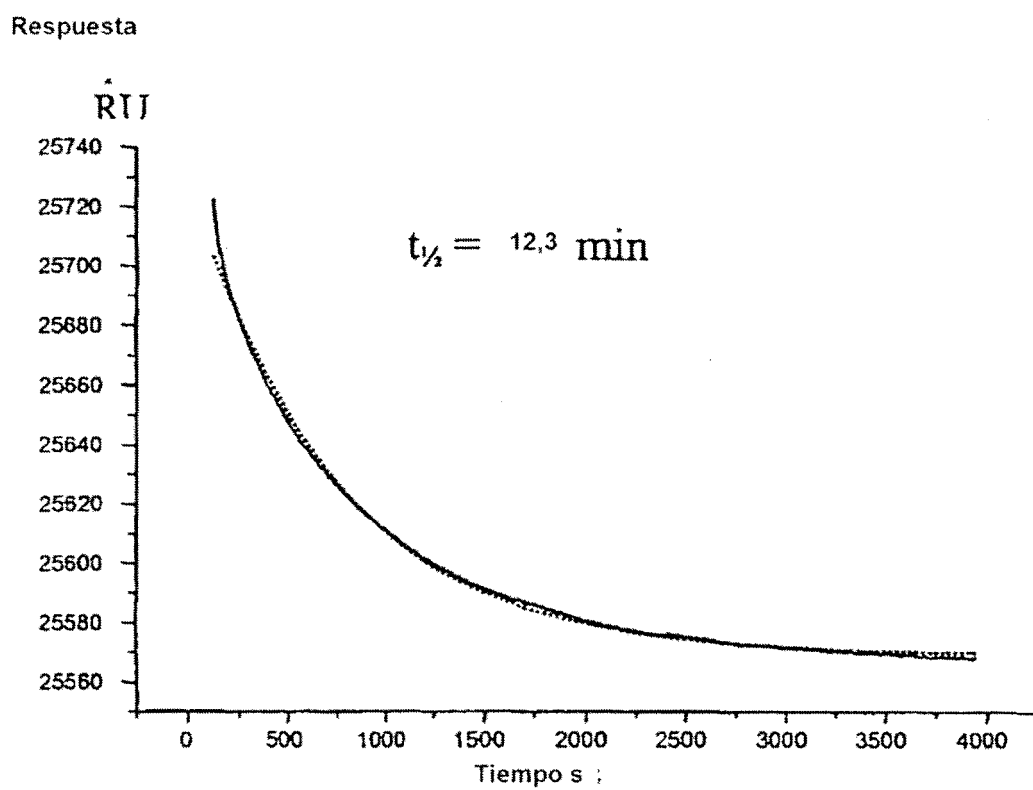


Figura 36

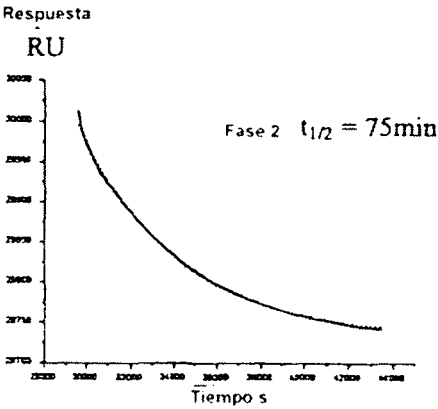
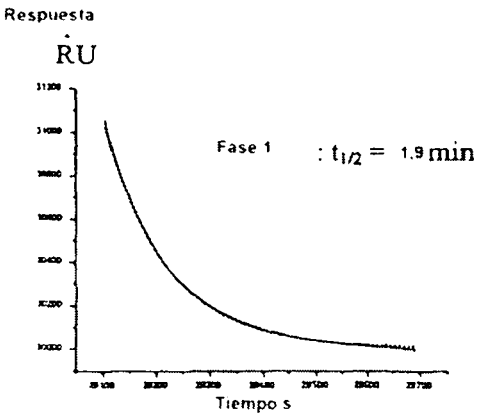
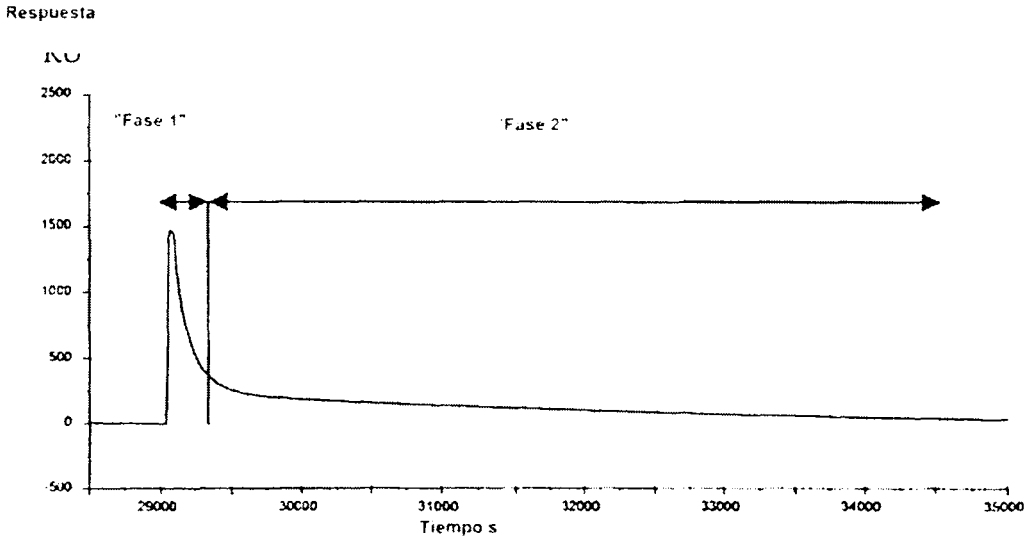


Figura 37a

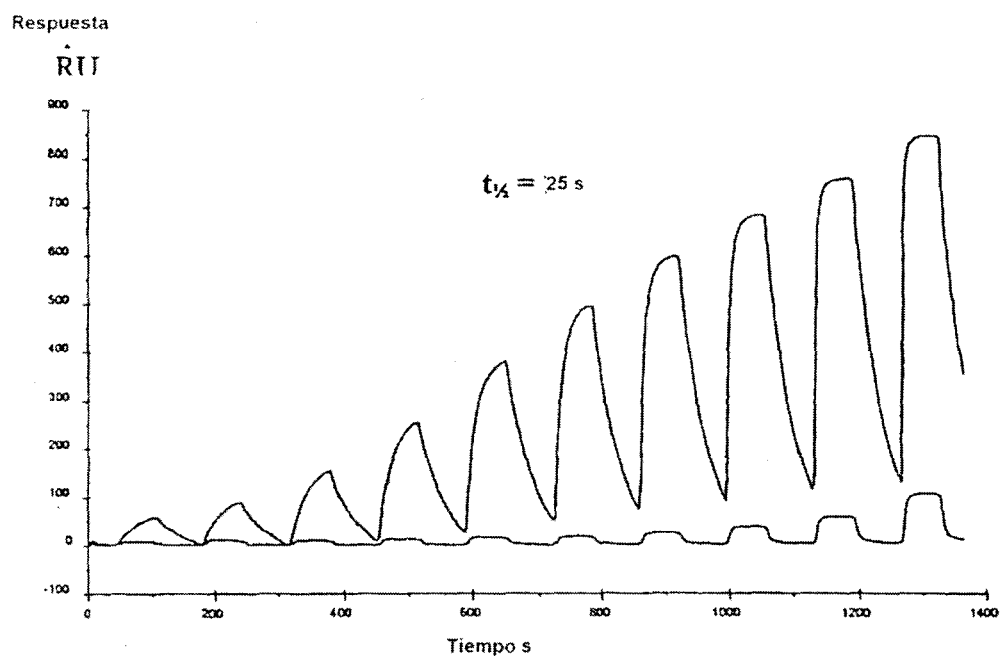
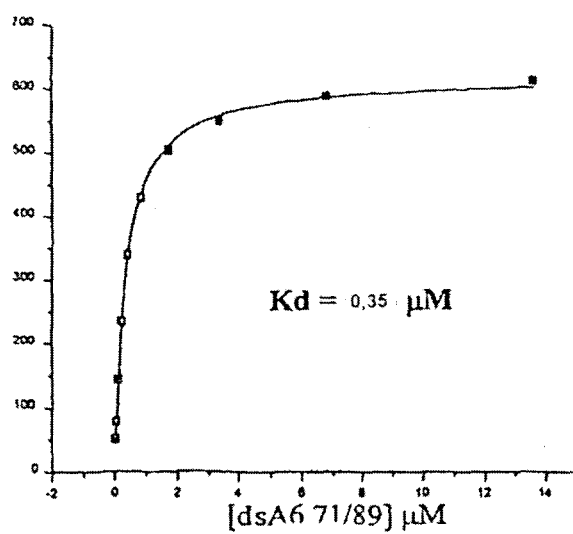


Figura 37b



ES 2 327 229 T3

Figura 38a

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF
CASRPGLAGG RPEQYFGPGT RLTVT (SEC ID 171)

Figura 38b

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF
CASRPGLMSAXPEQYFGPGT RLTVT (SEC ID 172)

X indica una posición en la que pueden insertarse los aminoácidos E, Q

Figura 38c

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF
CASRPGLAGG RPEDQYFGPGT RLTVT (SEC ID 173)

Figura 38d

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF
CASRPGLVPG RPEQQFGPGT RLTVT (SEC ID 174)

Figura 38e

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF
CASRPGLAGG RPHPQFGPGT RLTVT (SEC ID 175)

Figura 39a

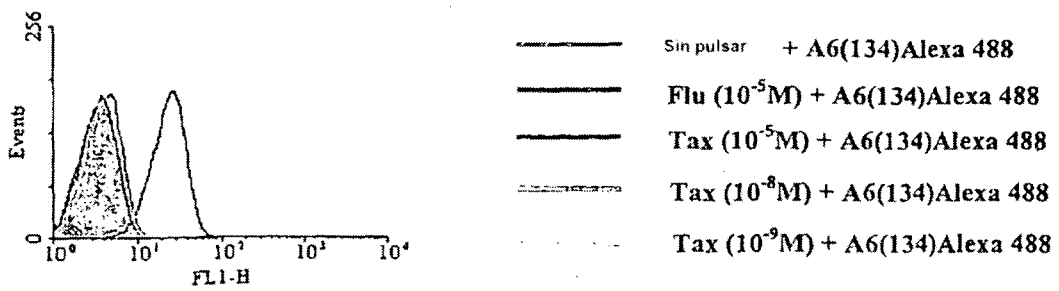
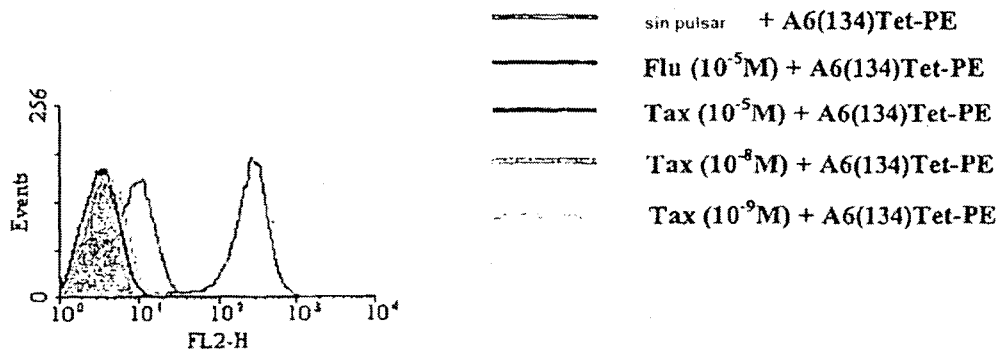


Figura 39b