

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 505**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2009 PCT/SG2009/000165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09136874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2009 E 09742949 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2288700**

54 Título: **Receptor de linfocito T (RLT) exógeno reactivo contra epítopo de VHB y usos del mismo**

30 Prioridad:

**09.05.2008 US 51974 P**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND  
RESEARCH (100.0%)  
1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis  
Singapore 138632, SG**

72 Inventor/es:

**BERTOLETTI, ANTONIO y  
GEHRING, ADAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 622 505 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

Receptor de linfocito T (RLT) exógeno reactivo contra epítipo de VHB y usos del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general al campo de las terapias inmunomediadas para el tratamiento de enfermedades del virus de la hepatitis B (VHB) y relacionadas con VHB, tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC), así como a métodos para preparar dichas terapias. En particular, las terapias inmunomediadas pueden ser en forma de células que expresan al menos un receptor de linfocitos T exógeno reactivo contra epítipo del VHB y/o polinucleótidos, vectores y/o polipéptidos que codifican el receptor de linfocitos T reactivo contra epítipo del VHB.

15 **Antecedentes de la técnica**

El virus de la hepatitis B (VHB) infecta el hígado de los homínidos, incluyendo los seres humanos, y causa una inflamación denominada hepatitis. Es un virus ADN y uno de los muchos virus no relacionados que causan la hepatitis vírica. Actualmente, el VHB infecta a al menos 350 millones de personas en todo el mundo. El 75 % de los pacientes infectados crónicamente con VHB vive en Asia, pero la difusión del virus es a nivel mundial. Por ejemplo, en los Estados Unidos, aproximadamente 1,5 millones de norteamericanos, o aproximadamente un 0,5 % de la población tienen VHB. La infección está especialmente extendida entre determinados grupos de riesgo, como los hombres que practican sexo con otros hombres, pacientes sometidos a diálisis renal y las personas con hemofilia. Las infecciones de VHB crónicas afectan a entre un 10 y un 15 % de la primera generación de norteamericanos de origen asiático y aproximadamente un 5 % de los niños adoptados provenientes de Rusia, Asia y Europa del Este tienen infecciones VHB crónicas. Las infecciones de VHB pueden derivar a la larga en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC), una enfermedad fatal con una escasa respuesta a la quimioterapia actual.

Los métodos de tratamiento disponibles actualmente para esta gran reserva de sujetos infectados crónicamente en todo el mundo suponen un desafío ya que los fármacos que existen suprimen, pero no eliminan el VHB. Aunque la mayoría de los pacientes infectados con VHB responden a los métodos de tratamiento de los que se dispone hoy en día y presentan mejoras en la histología hepática y el nivel sérico de alanina transaminasa (ALT), la mayoría de los pacientes sufren una recaída cuando se detiene el tratamiento. Por otra parte, los métodos de tratamiento de VHB más habituales implican el uso de fármacos como lamivudina y adefovir. Estos fármacos, sin embargo, tienen como resultado el desarrollo de una resistencia antiviral en los pacientes, determinada en aproximadamente un 20 % de los pacientes tratados con lamivudina y en aproximadamente un 3 % de los tratados con adefovir cada año. En última instancia, una gran proporción de los pacientes suele desarrollar resistencia, y llegado a este punto, los fármacos antivirales no tienen apenas efecto.

Por lo tanto, existe una necesidad a nivel mundial de un método eficaz de terapia antiviral que tenga como resultado una respuesta inmune específica para VHB para eliminar de forma eficaz y satisfactoria la forma circular covalentemente cerrada de VHB en un paciente. Los linfocitos T específicos de epítipo de VHB naturales encontrados en algunos sujetos conllevan que los sujetos tengan un control eficiente e innato de la infección de VHB. Los estudios anteriores han demostrado que en los pacientes con una infección VHB persistente/crónica los linfocitos T específicos de epítipo de VHB están suprimidos o funcionalmente alterados. Por lo tanto, un mayor conocimiento de las interacciones virus-hospedador durante la infección VHB ha llevado a especular que la restauración terapéutica de la inmunidad antiviral defectuosa presente en los pacientes con infección crónica podría conducir posiblemente a resolver la enfermedad. La validez de este concepto fue demostrado directamente en los pacientes con infección VHB crónica que habían sido sometidos a trasplante de médula ósea y habían recibido médulas de donantes con inmunidad a VHB natural. La infusión de un sistema inmune cebado con VHB sano llevó a superar la infección de VHB crónica en estos pacientes. Sin embargo, claramente, el trasplante de médula ósea no constituye una opción terapéutica fácil para pacientes infectados con VHB de manera crónica y las tentativas para reforzar la inmunidad específica de VHB utilizando diversas vacunas en pacientes con hepatitis B crónica han sido desalentadoras.

Una potencial causa del fracaso de la estrategia con vacuna terapéutica es el hecho de que el sistema inmune de los portadores crónicos de VHB no tiene la misma eficacia ni el repertorio de especificidades que el de un sujeto que no está infectado con VHB sano. Por otra parte, la alta producción persistente de antígenos virales en los pacientes infectados con VHB crónicos puede suprimir o inducir tolerancia de los linfocitos T específicos de antígeno. Los pacientes infectados con VHB crónicos se caracterizan por lo tanto por una baja respuesta o ausencia de respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de VHB. Asimismo, se ha especulado que tanto la baja avidéz de linfocitos T como un perfil de citocinas ineficaz generado como respuesta a infección VHB pueden contribuir al desarrollo de una infección VHB crónica en lugar de a la eliminación viral.

Existe una clara necesidad de terapias más eficaces que se dirijan a las moléculas que participan en el perfil de citocinas de pacientes infectados con VHB para reducir a nivel mundial la morbilidad y la mortalidad causada por infección de VHB y las neoplasias malignas relacionadas con VHB.

**Sumario de la invención**

La presente invención aborda los problemas que se han mencionado y, en particular, proporciona un método nuevo, eficiente y efectivo para tratar una infección por VHB redirigiendo la especificidad de los linfocitos de pacientes infectados con VHB crónicos empleando transferencia exógena del receptor de linfocitos T (RLT).

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona al menos un linfocito T aislado que comprende al menos un receptor de linfocito T (RLT) exógeno reactivo contra epítipo de VHB y/o un fragmento del mismo, siendo el epítipo de VHB restringido a HLA-A2 y siendo: epítipo HBc18-27 que comprende la SEQ ID NO: 25 y/o SEQ ID NO: 26; y/o epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58, y en el que el fragmento comprende un sitio activo que permite al receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB reconocer el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79. En particular, el epítipo HBs370-79 puede comprender la SEQ ID NO: 56.

En particular, el linfocito T de acuerdo con la presente invención puede comprender además al menos un segundo RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB, y/o fragmento del mismo, pudiendo ser el segundo epítipo de VHB diferente del primer epítipo de VHB. En particular, el primer epítipo de VHB puede ser HBc18-27 y el segundo epítipo puede ser HBs370-79.

El RLT puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 o mutantes de las mismas. En particular, el RLT exógeno comprende al menos una cadena  $\alpha$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. El RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\beta$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 o mutantes de la misma. Más en particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\beta$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23. En las Tablas 1 y 2, se muestran todas las secuencias.

En particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma y/o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24 o un fragmento de la misma, comprendiendo el fragmento un sitio activo que permite que el receptor de linfocito T exógeno reconozca el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79. Más en particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  de la SEQ ID NO: 12 y/o al menos una cadena  $\beta$  de la SEQ ID NO: 24.

El RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 o mutantes de la misma. En particular, el RLT exógeno comprende al menos una cadena  $\alpha$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. El RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\beta$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 o mutantes de las mismas. Más en particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\beta$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54. En las Tablas 1 y 2 se muestran todas las secuencias. El mutante retiene la capacidad de unirse y activar epítipo de VHB.

En particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 47 o un fragmento de la misma y/o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 55 o un fragmento de la misma, comprendiendo el fragmento un sitio activo que permite que el receptor de linfocito T exógeno reconozca el epítipo HBc18-27 y/o HBs370-79. Más en particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 47 y/o al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 55.

El linfocito T de la presente invención puede ser al menos un linfocito T derivado de linfocitos de sangre periférica (LSP).

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona al menos un polinucleótido aislado que comprende al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\alpha$  y/o al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\beta$ , en el que la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  forman parte de al menos un RLT reactivo contra epítipo de VHB exógeno, y en el que el epítipo de VHB es restringido a HLA-A2 y es: epítipo HBc18-27 que comprende las SEQ ID NO: 25 y/o 26; y/o epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58.

En particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 17, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 18 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19. Más

en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  puede comprender SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  puede comprender SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

5 En particular, la cadena  $\alpha$  del RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y/o la cadena  $\beta$  del RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20. Más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8, y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 20. Más en particular, la secuencia de la cadena  $\alpha$  del RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBC18-27 se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8, y/o la secuencia de la cadena  $\beta$  del RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBC18-27 se puede seleccionar con el grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 20.

15 En particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprenden SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, y SEQ ID NO: 50. Más en particular, la cadena  $\alpha$  del RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 43 y la cadena  $\beta$  del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB tiene al menos un 80 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 51. Incluso más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 43, y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende SEQ ID NO: 20 51. Más en particular, la secuencia de la cadena  $\alpha$  del RLT exógeno reactivo contra epítipo HBs370-79 puede comprender SEQ ID NO: 43 y/o la secuencia de la cadena  $\beta$  del RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBs370-79 puede comprender SEQ ID NO: 51.

25 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona al menos un polipéptido aislado codificado por al menos un polinucleótido de la presente invención.

30 El polipéptido aislado comprende: (a) una cadena  $\alpha$  que comprende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y/o una cadena  $\beta$  que comprende SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; y/o (b) una cadena  $\alpha$  que comprende SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y/o una cadena  $\beta$  que comprende SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54; siendo el polipéptido al menos un receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB y siendo el epítipo de VHB restringido a HLA-A2.

35 En particular, la cadena  $\alpha$  puede tener al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 12 y la cadena  $\beta$  puede tener al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24. En particular, la cadena  $\alpha$  puede tener al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 47 y la cadena  $\beta$  puede tener al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 55. En particular, el epítipo de VHB puede ser HBC18-27, HBs370-79 y/o un mutante de los mismos. Más en particular, el polipéptido puede ser al menos un RLT soluble o un fragmento o un fragmento del mismo. Más en particular incluso, el RLT soluble RLT o fragmento del mismo se puede unir a al menos un fármaco antiviral.

40 La presente divulgación proporciona al menos una construcción que comprende el polinucleótido de la presente invención conectado operativamente a al menos un promotor.

45 La presente divulgación proporciona además al menos un vector que comprende la construcción de acuerdo con la presente invención o el polinucleótido de acuerdo con la presente invención.

La presente divulgación proporciona también al menos un linfocito T que comprende el vector o la construcción de acuerdo con la presente invención.

50 La presente divulgación proporciona también al menos un método de preparación de al menos un linfocito T que comprende al menos un RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB para la entrega a al menos un sujeto, comprendiendo dicho método la transducción en al menos un linfocito T aislado del sujeto con la construcción o el vector de la presente invención.

55 La presente divulgación proporciona además al menos un método de preparación de al menos un RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB que comprende:

(a) aislar al menos un linfocito T reactivo contra epítipo de VHB de al menos un individuo expuesto a VHB que ha resuelto la infección VHB;

60 (b) clonar al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos una cadena  $\alpha$  y/o  $\beta$  de al menos un receptor de célula RLT del linfocito T reactivo contra epítipo de VHB de la etapa (a);

(c) entregar la secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) a al menos una célula; e

65

(d) incubar la célula en condiciones adecuadas para la expresión del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB.

5 En particular, el método de preparación de al menos un RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB comprende el aislamiento de al menos un linfocito T, etapa (a) que puede ser reactivo contra el epítipo HBc18-27 y/o reactivo contra el epítipo HBs370-79.

10 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona al menos un linfocito T de acuerdo con la presente invención y/o un polinucleótido de acuerdo con la presente invención y/o un polipéptido de acuerdo con la presente invención, para su uso en el tratamiento de infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

15 La presente divulgación proporciona además al menos un método de tratamiento de VHB y/o de inhibición de la reactivación de VHB en al menos un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de al menos una cantidad inmunoterapéuticamente efectiva de linfocitos, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente invención.

20 La presente divulgación proporciona también al menos un método de tratamiento de carcinoma hepatocelular relacionado con VHB en al menos un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de al menos una cantidad inmunoterapéuticamente efectiva de linfocitos, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente invención.

De acuerdo con uno de sus aspectos, la presente invención proporciona el menos un método *in vitro* para el diagnóstico de al menos un sujeto que es capaz de resolver la infección VHB, comprendiendo dicho método:

- 25 (a) proporcionar al menos una muestra de al menos un sujeto;  
 (b) detectar la presencia de al menos un polinucleótido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en al menos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, y/o un homólogo de las mismas; y/o  
 30 (c) detectar a presencia de al menos un polipéptido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, y/o un homólogo de las mismas;

35 en el que la presencia del polinucleótido y/o el polipéptido es indicativa de que el sujeto es capaz de resolver la infección VHB.

De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona al menos un método *in vitro* para el diagnóstico de al menos un sujeto que padece o está en riesgo de padecer infecciones VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB, comprendiendo dicho método:

- 40 (a) proporcionar al menos una muestra de al menos un sujeto;  
 (b) detectar la presencia de al menos un polinucleótido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste al menos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, y/o un homólogo de las mismas; y/o  
 45 (c) detectar a presencia de al menos un polipéptido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, y/o un homólogo de las mismas;

50 en el que hay una correlación entre la ausencia del polinucleótido y/o el polipéptido y la probabilidad de que el sujeto padezca o esté en riesgo de padecer infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

55 De acuerdo con otro aspecto más, la presente divulgación proporciona además al menos un uso de al menos un linfocito, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

60 La presente divulgación proporciona también al menos un kit para la detección y/o tratamiento de infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB, comprendiendo dicho kit al menos un linfocito, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos cualquiera de la presente invención.

**Breve descripción de las figuras**

5 La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de las etapas relacionadas con la producción de un linfocito que comprende al menos un receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB. Comprende el aislamiento de un clon de linfocito T de un paciente VHB pHLA-A2 positivo que ha resuelto la infección utilizando el clon de linfocito T para formar una construcción de vector retroviral que codifica receptor de linfocito T y utilizando el vector para formar células que expresan el receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB. La Figura 1 fue tomada en parte de Schumacher et al., 2002.

10 La Figura 2 (A) representa el análisis FACS de linfocitos de sangre periférica (LSP) que fueron estimulados con péptido HBc18-27 para generar líneas de linfocitos T. Se aisló la línea de linfocitos T específicos de HBc18-27 utilizando pentámeros HLA-A201 específicos de HBc18-27 y separación magnética. Se tiñó la línea de linfocitos T específicos de HBc18-27 aislados con pentámeros HLA-A201 específicos de HBc18-27 para confirmar la clonalidad. Los resultados mostraron que el 100 % de los linfocitos T eran CD8<sup>+</sup> y pentámero HLA-A2 positivos, indicando clonalidad.

15 La Figura 2 (B) muestra un gráfico con los resultados de la tipificación V beta de un clon de linfocito T potencial, C183, obtenido de un paciente VHB HLA-A201 que ha resuelto utilizando teñido con un panel de anticuerpos monoclonales (mAb) V beta de RLT. Los mAb que reaccionan con la región V beta de RLT humano son prácticamente tan específicos como el mAb idiopático privado al identificar clones de linfocitos T. Este método se utilizó por tanto para evaluar la expresión de familias génicas V beta. Se observó que el clon C183 era altamente específico para el epítipo 18-27 del núcleo de VHB (HBc 18-27). Los resultados sugieren que todos los linfocitos T fueron Vβ8 positivos.

20 La Figura 3 muestra la función citotóxica del clon C183 de linfocito T citotóxico (LTC) específico de HBc18-27. Se mezclaron células HepG2 marcadas con carboxifluoresceín succinimidil éster (CFSE) pulsadas con epítipo HBc18-27 (8-10 M) con células HepG2 que no fueron pulsadas con HBc18-27. Se cultivaron las células HepG2 en presencia o ausencia de clones LTC en una relación de 1:1 durante 5 h. Se determinó la citotoxicidad en virtud de la desaparición de las dianas marcadas con CFSE en presencia del clon C183 (\*C183). Al cabo de 5 h de co-incubación, los resultados mostraron que solamente permanecían las células CFSE negativas (sin péptido HBc18-27) y prácticamente todas las células HepG2 HBc18-27 positivas, CFSE positivas habían sido eliminadas por C183, lo que indica que el clon de linfocito T es capaz de eliminar células tumorales que presentan antígenos VHB como HBc18-27. No hubo ninguna diferencia significativa en el recuento celular cuando no se añadió LTC (NO LTC).

25 La Figura 4 muestra que el clon de linfocito T C183 reconoce antígeno viral procesado endógenamente presentado por células de carcinoma hepatocelular.

30 La Figura 4 (A) muestra los resultados del linfocito T citotóxico (LTC) específico de HBc18-27 C183, incubado con la línea celular HepG2 parental, solo vector (HepG2TA2-7) durante 5 h como control. Se sometió a ensayo el control para determinar la liberación de citocina y la degranulación citotóxica (teñido CD107a<sup>+</sup>), que puso de manifiesto que C183 no tuvo respuesta a la línea celular de control HepG2TA2-7 ya que no hubo activación para degranular (CD107a<sup>+</sup>) y no produjo IFN-γ.

35 La Figura 4 (B) muestra la activación del clon de linfocito T C183 después del co-cultivo con 105 células HepG2 que expresaron diferentes niveles de producción de IFN-γ estimulada por el antígeno VHB por la y degranulación, lo que indica que el clon de linfocito T C183 reconoce el epítipo HBc18-27 procesado y preparado por células de carcinoma hepatocelular. Se activó el 84 % de los clones de linfocito T al cabo de 5 h de co-cultivo con células HepG2 que expresan VHB.

40 La Figura 5 presenta los resultados de cómo el clon de linfocito T C183 T responde a hepatocitos infectados naturalmente. Se co-cultivaron los hepatocitos primarios que fueron aislados de hígados VHB crónicos explantados HLA-A2<sup>+</sup> o HLA-A2<sup>-</sup> con C183. Se midieron la degranulación de clon de linfocito T C183 específico de HBc18-27- y la producción de IFN-γ tras la incubación de C183 en solitario, con hepatocitos humanos primarios sin infectar HLA-A2<sup>+</sup>, infectados con VHB con despareamiento del HLA o infectados con VHB HLA-A2<sup>+</sup>. Se observó la activación de C183 (12 % CD107a<sup>+</sup>) solamente tras la incubación con hepatocitos humanos primarios infectados con VHB HLA-A2<sup>+</sup>, lo que indica que el clon de linfocito T C183 reconoce antígeno viral procesado endógenamente presentado por hepatocitos primarios infectados con VHB que expresan las moléculas HLA correctas en su superficie celular.

45 La Figura 6 muestra la capacidad del clon de linfocito T, C183, de reconocer el epítipo HBc18-27 de genotipos B y C de VHB (barras grises, virus Asia; C18-I) y genotipos A y D de VHB (barras negras, virus europeo/norteamericano; C18-V) presentados por diferentes subtipos la familia HLA-A2 CMH clase I. Se cargaron linfocitos B transformados con virus Epstein-Bar (VEB) con subtipos HLA-A2 conocidos en concentraciones crecientes de epítipo HBc18-27 de diferentes genotipos de VHB y se co-cultivaron con clon de

linfocito T C183 durante 5 h. Se midió la producción de IFN- $\gamma$  para determinar la activación de linfocito T. Los datos demuestran que las moléculas CMH Clase I (A) HLA-A201; (B) HLA-A206; y (C) HLA-A207 pudieron presentar el epítipo de VHB de todos los genotipos y fueron reconocidas por C183 y, por tanto, estimularon una producción de IFN- $\gamma$  eficiente de los linfocitos T. Se observó que el clon de linfocito T C183 fue capaz de reconocer el epítipo HBc18-27 con una alta sensibilidad ( $\leq 1$  pM) desde los genotipos B y C o los genotipos A y D y se reconoció el epítipo prácticamente de igual manera cuando fue presentado por los tres subtipos HLA-A2 más dominantes A0201 (A), A0206 (B) y A0207 (C).

La Figura 7 muestra el análisis de la eficacia de transducción del receptor de linfocito T (RLT).

La Figura 7 (A) muestra el análisis FACS de linfocitos de sangre periférica (LSP) cuando se simuló su transducción (control negativo) o se transdujeron con el RLT A201 HBc18-27 compuesto de cadenas V $\beta$ 8.2 y V $\alpha$ 3. Se tiñeron LSP para la cadena V $\beta$ 8 3 días después de la transducción para determinar la expresión del RLT HBc18-27 introducido. Los LSP con transducción simulada expresaron niveles endógenos de V $\beta$ 8 (CD8+ = 1,8 %; CD4+ = 2,1). La expresión de V $\beta$ 8 aumentó sustancialmente tras la transducción con el RLT A201 HBc18-27 en comparación con los linfocitos de transducción simulada, que expresaron únicamente niveles endógenos de V $\beta$ 8, indicando una transducción y expresión satisfactorias.

La Figura 7 (B) muestra los resultados obtenidos cuando se tiñeron linfocitos de transducción simulada o transducidas con RLT HBc18-27 con pentámero A201 específico de HBc18-27 para determinar si se expresaba la cadena V $\alpha$ 3 y se apareaba apropiadamente con la cadena V $\beta$ 8.2 en la superficie celular. El análisis del pentámero mostró que solamente los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 expresaban cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  apropiadas reconocidas por el pentámero A201 específico de HBc18-27 y que solamente las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  estaban apropiadamente apareadas en la superficie celular. No se detectó teñido en los linfocitos de transducción simulada ya que los LSP provenían de un donante sano que era HLA-A2 negativo.

La Figura 7 (C) muestra la frecuencia media de linfocitos T V $\beta$ 8+ de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg+ (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg- (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml). Esto indica que la cadena del RLT V $\beta$ 8 transducida se expresa igualmente bien en los pacientes VHB crónicos y en los donantes sanos.

La Figura 7 (D) muestra la frecuencia media de linfocitos T pentámero+ A201 específico de HBc18-27 de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg+ (AND VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg- (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml). Esto indica que el RLT transducido propiamente apareado se expresa igualmente bien en pacientes VHB crónicos y en donantes sanos.

La Figura 8 (A) muestra el análisis FACS de linfocitos T transducidos con RLT A201 HBc18-27 para confirmar que el RLT HBc18-27 introducido fue funcional. Se co-cultivaron durante toda la noche linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 y con transducción simulada con linfocitos T2 HLA-A2+ que fueron pulsados primero con péptido HBc18-27 ("péptido") y se incubaron durante 5 h. A continuación, se evaluó la función de los linfocitos T por teñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$  (columna de la izquierda), TNF- $\alpha$  (columna central) e IL-2 (columna de la derecha). En ausencia del péptido, los linfocitos transducidos con RLT HBc18-27 no se activaron (fila superior). Los linfocitos de transducción simulada no fueron activados por linfocitos T2 pulsados con péptido (fila central). Los linfocitos transducidos con RLT HBc18-27 fueron estimulados para producir IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-2 tras el co-cultivo con linfocitos T2 pulsados con péptido (fila de abajo). Tanto los CD8+ como los CD8- (linfocitos T CD4+) fueron capaces de producir las tres citocinas, lo que confirma la función del RLT introducido en los linfocitos T CD4+ y la capacidad multifuncional de linfocitos redirigidos a RLT.

La Figura 8 (B) demuestra que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 de pacientes VHB crónicos son igualmente funcionales para donantes sanos. Se muestra la frecuencia media de linfocitos IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 positivos de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg+ (AND VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg- (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml). Los resultados demuestran que los linfocitos T transducidos RLT con A201 HBc18-27 se hicieron multifuncionales.

La Figura 9 muestra la afinidad de los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 de donantes sanos y pacientes VHB crónicos en comparación con el clon de linfocito T C183 original.

La Figura 9 (A) muestra los resultados cuando se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 IFN- $\gamma$ + CD8+ y clones de linfocito T C183 con linfocitos T2 pulsados con concentraciones crecientes de péptido HBc18-27 durante 5 h y a continuación se tiñeron para IFN- $\gamma$ . Los datos se presentan como el porcentaje medio de respuesta máxima para linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 derivados de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg+ (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml) y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg- (AND VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml) siendo C183 100 % específico, al tiempo que la frecuencia de linfocito transducido con RLT varía. Los resultados demuestran que la afinidad para epítipo viral de linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 CD8+ derivados de linfocitos T de paciente fue idéntica cuando se comparó con el clon de linfocito T C183 original y reconoció epítipo hasta concentraciones tan bajas como de 0,1 - 1 pg/ml.

La Figura 9 (B) muestra los resultados cuando se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> y clones de linfocitos T C183 con linfocitos T2 pulsados con concentraciones crecientes de péptido HBc18-27 durante 5 h y después se tiñeron para IFN- $\gamma$ . Los datos se presentan como un porcentaje medio de la respuesta máxima para linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 derivados de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>+</sup> (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>-</sup> (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml) siendo C183 100 % específico al tiempo que la frecuencia de linfocito transducido con RLT varía. Los linfocitos transducidos con RLT HBc18-27 CD4<sup>+</sup> derivados de linfocitos T de paciente fueron menos sensibles en comparación con C183, pero el 50 % de los linfocitos T específicos de HBc18-27 se activaron a 100 pg/ml lo que indica que el RLT HBc18-27 introducido fue muy sensible incluso en ausencia del co-receptor CD8.

La Figura 10 muestra la expresión de RLT optimizado HBc18-Opt en comparación con RLT de tipo silvestre HBc18-WT.

La Figura 10 (A) muestra histogramas con el porcentaje de linfocitos T V $\beta$ 8<sup>+</sup> de linfocitos T con transducción simulada, transducidos con RLT HBc18-WT y con RLT HBc18-Opt. La frecuencia de linfocitos V $\beta$ 8<sup>+</sup> fue comparable entre los linfocitos transducidos con RLT HBc18 optimizado y de tipo silvestre.

La Figura 10 (B) muestra la comparación del nivel de expresión de V $\beta$ 8 en linfocitos T con transducción simulada, transducidos con RLT HBc18-WT y con RLT HBc18-Opt. Para comparar el nivel de expresión, se utilizó la intensidad de fluorescencia media (IFM) para células V $\beta$ 8<sup>+</sup>. Los resultados demuestran que no hubo ninguna diferencia significativa en el nivel de expresión V $\beta$ 8 entre los linfocitos transducidos con RLT optimizadas y de tipo silvestre.

La Figura 10 (C) muestra los resultados obtenidos del teñido de pentámero HLA-A2 específico de HBc18-27. Se tiñeron los linfocitos de cada grupo antes mencionadas con pentámeros anti-CD8 y HLA-A2específicos de HBc18-27. Se observó un aumento de casi al doble en la frecuencia de linfocitos pentámero positivos en linfocitos T transducidos con construcción RLT HBc18-Opt en comparación con RLT de tipo silvestre lo que indica que la cadena Va3 se puede expresar más eficazmente desde la construcción optimizada con codón en comparación con la secuencia de tipo silvestre.

La Figura 11 demuestra que existe una mayor frecuencia de linfocitos IFN- $\gamma$  positivos en linfocitos T transducidos con construcciones RLT HBc18-Opt en comparación con construcciones RLT HBc18-WT. Se estimularon durante toda la noche linfocitos T con transducción simulada, transducidos con RLT HBc18-WT y con RLT HBc18-Opt con linfocitos T2 HLA-A2 positivos que fueron pulsados inicialmente o no con péptido HBc18-27 en presencia de 2  $\mu$ g/ml brefeldina A. Se marcaron linfocitos T con anti-CD8 PE-Cy7 y se tiñeron para IFN- $\gamma$  por teñido de citocina intracelular. Los resultados demuestran que hubo un aumento casi al doble en la frecuencia de linfocitos T IFN- $\gamma$  positivos transducidos con RLT HBc18-Opt en comparación con linfocitos T transducidos con RLT HBc18-WT. El aumento de linfocitos pentámero positivos guarda una correlación el aumento de células funcionales capaces de responder a linfocitos T diana cargados con péptido.

La Figura 12 (A) Se cargaron linfocitos B transformados con VEB que expresan subtipos HLA-A0201, -A0206 o A0207 con concentraciones crecientes de epítipo HBc18-27 del genotipo A/D de VHB (en la Tabla 1 se facilitan las secuencias 1) y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 durante 5 horas. Se midió la activación de linfocitos T por teñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$ . Los resultados demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 reconocen el epítipo HBc18-27 presentado por múltiples subtipos HLA-A2.

La Figura 12 (B) Se cargaron linfocitos B transformados con VEB que expresan los subtipos HLA-A0201, -A0206 or-A0207 con concentraciones crecientes de epítipo HBc18-27 del genotipo B/C de VHB (en la Tabla 1 se facilitan las secuencias) y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 durante 5 h. Se midió la activación de linfocitos T por teñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$ . Los resultados demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 RLT reconocieron el epítipo HBc18-27 presentado por múltiples subtipos de HLA-A2.

La Figura 12 (C) muestra los resultados cuando se cargaron linfocitos T2 HLA-A2<sup>+</sup> con cada uno de los péptidos mutantes del epítipo HBc18-27 y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 durante 5 h. Se determinó el reconocimiento de los linfocitos T de los péptidos mutantes por teñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$ . En la Tabla 1, se facilitan las secuencias de los péptidos mutantes. Tal como se puede observar de los resultados, los linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 reconocieron varios mutantes del epítipo HBc18-27. El No estimado 1 No estimado 2 se refieren al control en el que no se cargaron linfocitos T2 HLA-A2<sup>+</sup> con ningún péptido mutante.

La Figura 13 (A) Se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT de cada grupo de pacientes (sano, HBeAg(-), HBeAg(+)) con células Hepg2 marcadas con DiOC que expresaban el genoma de VHB completo (VHB-HepG2) o la línea celular de control parental (Ctrl-HepG2) en una relación Efector:Diana de 1:1 durante 6 h en presencia de

yoduro de propidio (PI). Los linfocitos T diana coloreados fueron DiOC+/PI+. Los resultados son representativos de 3 experimentos. Se consideró que linfocitos T efectores eran linfocitos IFN- $\gamma$ + /CD8+ según el teñido de citocina intracelular tras la estimulación con linfocitos T2 pulsados con péptido. Los resultados mostraron que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 pueden eliminar líneas celulares CHC que expresan endógenamente proteínas VHB o están cargados con el péptido VHB 18-27.

La Figura 13 (B) Se cargaron líneas de células CHC marcadas con DiOC (HepG2, SNU-387, SNU-368) con concentraciones crecientes de péptidos HBc18-27 y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 RLT en una relación efector a diana de 1:1 durante 6 h en presencia de yoduro de propidio (PI). Los linfocitos T diana coloreados fueron DiOC+/PI+. Los resultados son representativos de 3 experimentos. Se consideró que los linfocitos T efectores eran linfocitos IFN- $\gamma$ + /CD8+ según se determinó por teñido de citocina intracelular tras la estimulación con linfocitos T2 pulsados con péptido. Los resultados demostraron que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 fueron capaces de eliminar múltiples líneas celulares CHC HLA-A2+.

La Figura 14 (A) demuestra que el clon de linfocito T E10-1D o los linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 reconocen linfocitos T2 HLA-A2+ cargados con el epítipo HBs370-79. El clon de linfocitos T E10-1D T se genera de acuerdo con el método proporcionado en el Ejemplo 10. Se cargaron linfocitos T2 con concentraciones crecientes de péptido HBs370-79 y se co-cultivaron con E10-1D o con linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 durante 5 h y se tiñeron para IFN- $\gamma$ . Los datos se presentan como porcentaje de respuesta máxima para normalizar la frecuencia diferencial de cada línea. Los resultados demuestran que RLT específico de HBs370-79 es funcional.

La Figura 14 (B) demuestra que los linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 reconocen variantes genotípicas de epítipo HBs370-79 (En la Tabla 2 se facilitan las secuencias de las variantes genotípicas). Se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 RLT con linfocitos T2 HLA-A2+ cargados con 1  $\mu$ g/ml de péptido de cada genotipo durante 5 h y se evaluó la activación por marcado con CD107a y teñido para IFN- $\gamma$ . Las secuencias de los genotipos A y D son idénticas. Los resultados demuestran que RLT específico de HBs370-79 reconoce las variantes genotípicas del epítipo HBs370-79.

### 30 Descripción detallada de la invención

Las referencias bibliográficas que se mencionan en la presente memoria descriptiva se enumeran en forma de una lista de referencias y se incluyen al final de los ejemplos.

### 35 Definiciones

Para mayor facilidad, a continuación se recogen determinados términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

40 El término "comprende" se define en el presente documento como aquel que indica que se pueden emplear conjuntamente varios componentes, ingredientes o etapas para poner en práctica la presente invención. En consecuencia, el término "comprende" abarca las expresiones más restrictivas "consiste esencialmente en" o "consiste en."

45 Con la expresión "consiste esencialmente en" se entiende que el polipéptido y/o polinucleótido exógeno RLT de acuerdo con la invención comprende "sustancialmente" la secuencia indicada como elemento "esencial". Las secuencias adicionales se pueden incluir en el extremo 5' y/o en el extremo 3'. En consecuencia, un polipéptido "que consiste esencialmente en" la secuencia X no será nuevo a la vista de un polipéptido conocido que comprenda la secuencia X accidentalmente.

50 Con la expresión "consiste en" se entiende que el polipéptido y/o polinucleótido de acuerdo con la invención corresponde a al menos una de las secuencias indicadas (por ejemplo, una secuencia específica indicada con un número de SEQ ID o una secuencia homóloga o un fragmento de la misma).

55 El término "receptor de linfocito T exógeno" (RLT) se define en el presente documento como un RLT recombinante que se expresa en un linfocito mediante la introducción de secuencias de codificación exógenas para un RLT. En particular, el RLT reactivo contra epítipo de VHB puede expresarse en un linfocito en el que el RLT o bien no se expresa de forma natural o bien se expresa a niveles que son insuficientes para inducir una respuesta del linfocito o una célula respondedora tras la unión de ligando a RLT.

60 El término "fragmento" se define en el presente documento como una porción incompleta o aislada de la secuencia completa del RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB que comprende el (los) sitio(s) activo(s) que confiere(n) la secuencia con las características y la función del RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB. En particular, puede ser más corta en al menos un nucleótido o aminoácido. Más en particular, el fragmento comprende el (los) sitio(s) activo(s) que permite(n) que el RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB reconozca el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79.

La expresión “receptor de linfocito T reactivo (RLT) con el epítipo de VHB” se define en el presente documento como un RLT que se une a un epítipo de VHB en el contexto de una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) para inducir una respuesta auxiliar o citotóxica en el linfocito que expresa el RLT recombinante. En particular, el epítipo de VHB puede ser HBc18-27. Más en particular, el epítipo de VHB puede comprender la secuencia of SEQ ID NO: 25. El epítipo de VHB puede ser HBs370-79. Más en particular, el epítipo de VHB puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 58.

El término “epítipo HBc 18-27” se define en el presente documento como un epítipo que puede estimular linfocitos T restringidos a HLA clase I. En la presente invención, se puede utilizar indistintamente como HBc18, HBc18-27, HBc18-27 péptido y el péptido. La secuencia del epítipo puede ser "FLPSDFFPV" (SEQ ID NO: 25). En la presente invención, el término HBc18-27 se utiliza para referirse al epítipo HBc18-27 del genotipo A/D prevalente entre los caucásicos de secuencia SEQ ID NO: 25 a no ser que se señale de otro modo. La región del receptor de linfocito T que se une al epítipo se denomina RLT HBc18-27 o RLT HBc18.

El término “epítipo HBs370-79” se define en el presente documento como un epítipo que puede estimular linfocitos T restringidos a HLA clase I. La secuencia del epítipo puede ser "SIVSPFIPL" (SEQ ID NO: 56). En la presente invención, el término HBs370-79 se utiliza para referirse al epítipo HBs370-79 del genotipo A/D prevalente entre los caucásicos de SEQ ID NO: 56 a no ser que se señale de otro modo. La región del receptor de linfocito T que se une al epítipo se denomina RLT HBs370-79.

La expresión "cantidad inmunoterapéuticamente eficaz" se define en el presente documento como una cantidad que tiene como resultado un efecto terapéutico o profiláctico inmunomediado en el sujeto, es decir, la cantidad que previene o reduce los síntomas en al menos un 50 % en comparación con los síntomas previos al tratamiento y en comparación con un control adecuado.

El término “aislado” se define en el presente documento como un componente biológico (como un ácido nucleico, un péptido o una proteína) que ha sido sustancialmente separado, producido aparte, o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que aparece dicho componente de manera natural, es decir, otro ARN y ADN cromosómico o extracromosómico y proteínas. Entre los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se aíslan de esta forma se incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas a través de los métodos de purificación convencionales. El término abarca asimismo ácidos nucleicos, péptidos y proteínas, preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos químicamente sintetizados.

La expresión “conectado operativamente” se define en el presente documento como una unión funcional entre secuencias reguladoras (tales como un promotor y/o una matriz de sitios de unión a factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos, dirigiendo las secuencias reguladoras. La transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

El término “mutante” o la expresión “forma mutante” de un epítipo de RLT se define en el presente documento como aquel que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que varía al menos una secuencia que codifica virus de referencia por sustitución, supresión o adición de al menos un aminoácido, pero que retiene la capacidad de unirse y activar el RLT unido y es activado por el epítipo no mutado. En particular, los mutantes pueden darse de forma natural o se pueden producir por recombinación o síntesis.

La expresión “RLT soluble” se define en el presente documento como una forma soluble (secretada) del RLT unido a membrana que es la molécula responsable del reconocimiento de linfocitos T del antígeno para el que es específico. En su forma soluble, es análogo a un anticuerpo monoclonal, exceptuando que reconoce fragmentos de péptidos asociados con moléculas CMH, mientras que los anticuerpos reconocen determinantes en una proteína completa. En particular, el polipéptido aislado de la presente invención se puede producir como un RLT soluble aplicado cualquier método conocido en la técnica. Más en particular, el RLT soluble se puede unir al epítipo HBc18-27 y/o HBs370-79 de VHB.

El término “sujeto” se define en el presente invención como un ser vertebrado, en particular un mamífero, más en particular un ser humano. Para los fines de la investigación, el sujeto puede ser al menos un modelo animal, p.ej. un ratón, una rata y similares. En particular, para los modelos animales, la secuencia de las cadenas  $\alpha$ - y  $\beta$ - de RLT se puede seleccionar en función de la especie. En algunos casos, también pueden ser útiles animales transgénicos que expresan moléculas CMH humanas para evaluar aspectos específicos de la presente invención.

Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que es posible poner en práctica la presente invención sin una experimentación indebida de acuerdo con el método que se ofrece en el presente documento. Los métodos, técnicas y sustancias químicas son las que se describen en los documentos de referencia dados o en los protocolos de biotecnología convencionales, así como en los manuales de biología molecular.

En uno de los aspectos de la presente invención, se proporciona al menos un linfocito T aislado que comprende al menos un receptor de linfocito T (RLT) exógeno reactivo contra el epítipo de VHB y/o un fragmento del mismo, siendo el epítipo de VHB restringido a HLA-A2 y siendo el epítipo HBc18-27 que comprende SEQ ID NO: 25 y/o

SEQ ID NO: 26; y/o el epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58, y comprendiendo el fragmento un sitio activo que permite que el receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB reconozca el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79. Dichos linfocitos T pueden ser útiles para su uso en protocolos de transferencia adoptiva para proporcionar un modo de tratamiento particularmente eficaz. Los linfocitos T aislados de la presente invención pueden eludir el problema de la supresión o función sub-óptima de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicos de VHB que puede estar presente en pacientes con infección VHB crónica. En particular, se puede utilizar el RLT de un paciente que ha resuelto la infección VHB para redirigir la especificidad de los linfocitos de pacientes VHB crónicos para transferencia de RLT.

En particular, los RLT reactivos contra VHB pueden prepararse transformando o transduciendo al menos un linfocito T aislado con uno o más polinucleótidos que codifican cadenas  $\alpha$ - y/o  $\beta$ - funcionales y/o polipéptidos de cadenas  $\alpha$ - y/o  $\beta$ - funcionales que se pueden ensamblar para formar al menos un RLT reactivo contra epítipo de VHB. En particular, el linfocito T aislado puede aislarse aplicando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica. Más en particular, se puede utilizar para aislar el linfocito T al menos un kit de aislamiento de célula, centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque, sistema de separación de células activadas por fluorescencia BD FACSAria y similares.

El linfocito T puede ser al menos una célula autóloga, es decir, se puede derivar de al menos un sujeto que puede recibir los linfocitos transducidos o transformados resultantes. En particular, los linfocitos T se pueden derivar de linfocitos de sangre periférica y/o células madre hematopoyéticas del sujeto. Más en particular, el linfocito aislado puede ser al menos un linfocito T que expresa intrínsecamente al menos un marcador de superficie celular CD4<sup>+</sup>, al menos un marcador tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, al menos un marcador de superficie celular CD8, al menos un marcador de superficie celular CD8<sup>+</sup>, tanto marcador CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> o marcadores de superficie superficial ni CD4<sup>+</sup> ni CD8<sup>+</sup>. En particular, la célula de acuerdo con la presente invención puede ser al menos un linfocito T que también expresa de forma natural al menos un RLT. El RLT exógeno reactivo contra VHB puede unirse al mismo epítipo que el RLT que se expresa de forma natural, y/o puede unirse a un epítipo diferente. En particular, el RLT exógeno reactivo contra VHB se puede expresar en al menos un linfocito T en el que el RLT puede expresarse o no de forma nativa o se puede expresar a niveles que puedan ser insuficientes para inducir una respuesta del linfocito T o la célula respondedora tras la unión al ligando del RLT. En particular, el linfocito T aislado de acuerdo con la presente invención puede transducirse con dos o más RLT exógenos reactivos con VHB diferentes, es decir, RLT que se unen a dos o más epítipos de VHB diferentes.

Los pacientes expuestos a VHB que han eliminado sus infecciones víricas, pueden proporcionar una excelente fuente de linfocitos T reactivos con VHB que expresan RLT de alta afinidad. En particular, los RLT reactivos con epítipo de VHB se pueden preparar aislando al menos un linfocito T reactivo contra VHB de al menos un individuo avirémico expuesto a VHB y clonando la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas  $\alpha$ - y  $\beta$  del RLT del linfocito T reactivo contra VHB. Una de estas secuencias ha sido clonada con los métodos convencionales conocidos en la técnica, las secuencias se pueden derivar de al menos un linfocito aislado y el linfocito aislado se puede incubar en condiciones adecuadas para la expresión del RLT a través del linfocito aislado. Más en particular, las condiciones adecuadas pueden incluir condiciones de cultivo celular convencionales. Cuando se expresa *in vivo* o *ex vivo* el RLT, se puede evaluar la reactividad de la célula que expresa RLT con epítipos VHB, entre otros parámetros de interés, tal como se conoce en la técnica y como se ilustra más adelante. En algunos protocolos, es decir, en aquellos en los que se puede administrar el vector a al menos un sujeto, se puede expresar el RLT también *in vivo* para proporcionar un efecto terapéutico en al menos un sujeto que lo necesita, es decir, al menos un sujeto con infección VHB crónica o aguda o una afección asociada con VHB.

Los RLT reactivos con VHB de acuerdo con la presente invención pueden ser funcionales en el linfocito aislado en la que se pueden expresar. En particular, pueden ser heterodímeros funcionales de cadenas de RLT  $\alpha$  y  $\beta$  asociadas con un complejo CD3 que reconoce al menos un epítipo de VHB en el contexto de al menos una molécula CMH clase I o Clase II. En los seres humanos, la restricción a CMH de al menos un epítipo puede ser dependiente en al menos un Antígeno de Leucocito Humano (HLA) en particular, expresado por al menos un linfocito que presenta el antígeno. Los RLT reactivos con VHB que pueden reconocer epítipos VHB pueden estar restringidos a un tipo HLA (es decir, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, y HLA-DRB1). Para los fines del presente estudio, el RLT reactivo contra VHB puede reconocer al menos un epítipo de VHB en el contexto de al menos una molécula CMH de al menos una especie distinta a la humana, p.ej., H-2K de ratón.

El RLT reactivo contra VHB reconoce epítipos de VHB que son restringidos a HLA-A2. Aproximadamente un 50 % de la población general expresa la molécula HLA-A1 CMH Clase I, un serotipo HLA-A. Por lo tanto, los RLT restringidos a HLA-A2 pueden encontrar un uso terapéutico generalizado. En particular, el subtipo puede identificar productos génicos de muchos alelos de HLA-A\*02, que comprenden los productos génicos HLA-A\*0201, \*0202, \*0203, \*0206, y \*0207. Puede haber distintas diferencias en los subtipos entre poblaciones caucásicas y asiáticas. Mientras que más de un 95 % de la población caucásica HLA-A2 positiva es HLA-A0201 la población china HLA-A2 positiva se puede descomponer en 23 % HLA-A0201; 45 % HLA-A0207; 8 % HLA-A0206; 23 % HLA-A0203.

Los RLT de la presente invención son reactivos con el epítipo de VHB. Se puede encontrar una lista de epítipos de VHB inmuno-reactivos conocidos y sus secuencias en la página 233, capítulo 11 (Efecto de patógenos en el sistema inmune: hepatitis vírica) del manual In immunodominance: The choice of the Immune System, J.A. Frelinger, ed (Weinheim: WileyEPVCH). El epítipo de VHB puede comprender al menos un antígeno del núcleo, antígeno de la envoltura, antígeno de la superficie y/o mutantes de los mismos.

El epítipo de VHB comprende al menos un antígeno del núcleo de hepatitis B y/o mutantes del mismo. Más en particular, el epítipo de VHB puede comprender HBc18-27 y/o mutantes del mismo. El epítipo HBc18-27 puede comprender "FLPSDFFPSV" (SEQ ID NO: 25) o mutantes del mismo. Asimismo, el epítipo HBc18-27 presente en el genotipo A y D que puede comprender "FLPSDFFPSV" (SEQ ID NO: 25), que es sobre todo prevalente en Europa, difiere del epítipo HBc18-27 de los genotipos B y C que puede comprender "FLPSDFFPSI" (SEQ ID NO: 26), que es sobre todo prevalente en Asia.

En particular, el epítipo de VHB puede comprender al menos un antígeno de la envoltura de hepatitis B y/o mutantes del mismo. Más en particular, el epítipo de VHB puede comprender HBs370-79 y/o mutantes del mismo. El epítipo HBs370-79 puede comprender "SIVSPFIPLL" (SEQ ID NO: 56) o mutantes del mismo. Asimismo, el epítipo HBs370-79 presente en el genotipo A y D que puede comprender "SIVSPFIPLL" (SEQ ID NO: 56), que son los más prevalentes en Europa, difiere del epítipo HBs370-79 del genotipo B que puede comprender "NILSPFMPLL" (SEQ ID NO: 57), y el epítipo del genotipo C que puede comprender "NILNPFLPLL" (SEQ ID NO: 58), que es el más prevalente en Asia.

En particular, el linfocito T de acuerdo con la presente invención puede comprender además al menos un segundo RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB y/o fragmento del mismo, pudiendo ser el segundo RLT exógeno reactivo contra VHB el mismo epítipo que el primero o diferente del primer epítipo de VHB. En particular, el segundo epítipo de VHB puede ser HBs370-79 y el primer epítipo puede ser HBc18-27.

El RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y/o mutantes de los mismos. En particular, el RLT exógeno comprende al menos una cadena  $\alpha$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. Más en particular, la cadena  $\alpha$  comprende las tres secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. La cadena  $\alpha$  puede comprender la secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 consecutivamente. En particular, la cadena  $\alpha$  puede consistir esencialmente en las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En las Tablas 1 y 2 se ofrecen todas las secuencias de la presente invención.

El RLT exógeno puede comprender además al menos una cadena  $\beta$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 y/o mutantes de los mismos. En particular, la cadena  $\beta$  puede comprender las tres secuencias, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23. En particular, la cadena  $\beta$  puede comprender la secuencias SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 consecutivamente. Más en particular, la cadena  $\beta$  puede consistir esencialmente en las secuencias SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23.

En particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma y/o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24 o un fragmento de la misma. En particular, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  pueden ser en al menos un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idénticas a SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 24 respectivamente. Más en particular, la cadena  $\alpha$  puede comprender todas las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y la cadena  $\beta$  puede comprender todas las secuencias SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23.

El RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y/o mutantes de los mismos. En particular, el RLT exógeno comprende al menos una cadena  $\alpha$  que comprende las secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. Más en particular, la cadena  $\alpha$  comprende todas las secuencias, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. La cadena  $\alpha$  puede comprender la secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 consecutivamente. En particular, la cadena  $\alpha$  puede consistir esencialmente en las secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. En las Tablas 1 y 2 se ofrecen todas las secuencias utilizadas en la presente invención.

El RLT exógeno puede comprender además al menos una cadena  $\beta$  que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y/o mutantes del mismo. En particular, la cadena  $\beta$  puede comprender las tres secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54. En particular, la cadena  $\beta$  puede comprender las secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 consecutivamente. Más en particular, la cadena  $\beta$  puede consistir esencialmente en las secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54.

- En particular, el RLT exógeno puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 47 o un fragmento de la misma y/ o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 55 o un fragmento de la misma. En particular, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  pueden ser en aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idénticas a SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55 respectivamente. Más en particular, la cadena  $\alpha$  puede comprender todas las secuencias SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y la cadena  $\beta$  puede comprender todas las secuencias SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54.
- Se ha determinado que las secuencias que codifican la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  son la secuencia de aminoácidos para al menos una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  reordenada productivamente respectivamente de un RLT reactivo contra el epítipo de VHB HBc18-27 y/o HBs370-79.
- Más en particular, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBc18-27 puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 12 y/o al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 24. Más en particular aún, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBc18-27 puede consistir esencialmente en al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 12 y al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 24. El RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBc18-27 puede consistir en al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 12 y al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 24. En particular, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB Bc18-27 puede consistir en dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ .
- Más en particular, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBs370-79 puede comprender al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 47 y/o al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 55. Más en particular aún, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBs370-79 puede consistir esencialmente en al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 47 y al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 55. El RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBs370-79 puede consistir en al menos una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO: 47 y al menos una cadena  $\beta$  de SEQ ID NO: 55. En particular, el RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB HBs370-79 puede consistir en dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ .
- El porcentaje de identidad se puede determinar utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2264-68 (1990), modified Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5873-77 (1993)). Dicho algoritmo se incorpora en el programa BLASTx, que se puede utilizar para obtener la secuencia de aminoácidos homólogos al polipéptido de referencia. La presente invención también puede abarcar las cadenas  $\alpha$  o las cadenas  $\beta$  de RLT que tienen la secuencia de aminoácidos que incluye sustituciones de aminoácidos conservadoras. Dichas sustituciones son bien conocidas en la técnica.
- De acuerdo con otro de sus aspectos, la presente invención proporciona al menos un polinucleótido aislado que comprende al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\alpha$  y/o al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\beta$  en el que la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  codificada puede formar parte de al menos un RLT reactivo contra el epítipo de VHB, siendo el epítipo de VHB restringido a HLA-A2 y siendo: epítipo HBc18-27 que comprende SEQ ID NO: 25 y/o SEQ ID NO: 26 y/o epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58.
- En particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 17, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 18 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19. Más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  puede comprender SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  puede comprender SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.
- En particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  del RLT reactivo contra el epítipo HBc-18-27 puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  del RLT exógeno reactivo contra epítipo HBc-18-27 puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20. En particular, la(s) secuencia(s) que codifica(n) la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  puede(n) ser en al menos aproximadamente 85 %, al menos en aproximadamente 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idénticas a SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20 respectivamente. Más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8, y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 20. El RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBc-18-27 puede comprender dos cadenas  $\alpha$  codificadas por la secuencia SEQ ID NO: 8 y dos cadenas  $\beta$  codificadas por SEQ ID NO: 20. Más en particular, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  pueden estar codificadas por las secuencias de nucleótidos que comprenden la secuencia consecutiva presentada en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20 respectivamente.
- Más en particular aún, el RLT exógeno puede consistir esencialmente en al menos una cadena  $\alpha$  codificada por SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y al menos una cadena  $\beta$  codificada por SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20. El RLT

exógeno puede consistir en al menos una cadena  $\alpha$  codificada por SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y al menos una cadena  $\beta$  codificada por SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20. En particular, el RLT exógeno puede consistir en dos cadenas  $\alpha$  codificadas por SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y dos cadenas  $\beta$  codificadas por SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20.

5 En particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, y SEQ ID NO: 50.

10 Más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  del RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBs370-79 puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 43 y la cadena  $\beta$  del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra el epítipo HBs370-79 tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 51. En particular, la(s) secuencia(s) que codifica(n) la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  puede(n) ser en al menos aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idénticas a SEQ ID NO: 43 y/o SEQ ID NO: 51 respectivamente. Más en particular, la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  puede ser SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 51, y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  puede ser SEQ ID NO: 51. El RLT exógeno reactivo contra el epítipo HBs370-79 puede comprender dos cadenas  $\alpha$  codificadas por la secuencia SEQ ID NO: 43 y dos cadenas  $\beta$  codificadas por SEQ ID NO: 51. Más en particular, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  pueden estar codificada por secuencias de nucleótidos que comprenden la secuencia consecutiva presentada en SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 51 respectivamente.

20 La presente invención proporciona además al menos un polipéptido aislado codificado por los nucleótidos de la presente invención.

25 El al menos un polipéptido aislado puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En particular, el polipéptido puede tener al menos un 80 de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 12. Más en particular, el polipéptido puede ser al menos en aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 idéntico a SEQ ID NO: 12.

30 El al menos un polipéptido aislado puede comprender al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. En particular, el polipéptido puede tener al menos un 80 de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 47. Más en particular, el polipéptido puede ser al menos en aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idéntico a SEQ ID NO: 47.

35 El polipéptido puede comprender además al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23. En particular, la secuencia puede tener al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 24. Más en particular, la secuencia adicional puede ser en al menos aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 24. Más en particular incluso, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos consecutivos presentada en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 24 respectivamente.

45 El polipéptido puede comprender además al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54. En particular, la secuencia adicional puede tener al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 55. Más en particular, la secuencia adicional puede ser al menos en aproximadamente un 85 %, al menos en aproximadamente un 90 %, o al menos en aproximadamente un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 55. Más en particular incluso, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos consecutiva presentada en SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 55 respectivamente.

50 El polipéptido de acuerdo con la presente invención puede ser al menos un RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB. En particular, el polipéptido puede ser funcionalmente equivalente a una secuencia de RLT ilustrada específicamente que puede haber sido modificada por sustituciones de aminoácido simples o múltiples, por adición Y/o supresión de aminoácidos, o en la que se ha modificado químicamente uno o más aminoácidos, pero que no obstante retiene la especificidad de unión y una alta actividad de unión de afinidad de la proteína del RLT de la presente invención con el epítipo de VHB. En particular, el epítipo de VHB puede ser HbC18-27, HBs370-79 o un mutante de los mismos. Más en particular, el polipéptido puede ser al menos un RLT soluble. Más en particular incluso, la proteína del RLT soluble puede carecer de porciones del RLT unido al linfocito natural y puede ser estable en solución (es decir., generalmente no se agrega en solución cuando se maneja tal como se ha descrito en el presente documento en condiciones normales para soluciones de proteína).

60 El RLT soluble se puede preparar a través de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de procesos que se pueden emplear para preparar el RLT soluble pueden comprender, pero no se limitan a ellos, construcción de cadenas de receptor poliméricas en las que se puede sustituir una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de al menos un anticuerpo específico de fosforilcolina con regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$  del RLT introduciendo codones de terminación de la traducción en dirección 5' de la región transmembrana del RLT o

65

reemplazando dominios transmembrana de los ADNc de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del RLT con una señal para la unión de glucosilfosfatidil inositol (PIG) desde el término carboxilo de la proteína Thy-2 unida a PIG.

5 El RLT soluble se puede unir a al menos un fármaco antiviral. El fármaco antiviral puede dirigirse a VHB. Por ejemplo, los fármacos antivirales pueden comprender, pero sin limitarse solo a ellos, adefovir dipivoxil, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, lamivudine, entecavir, telbivudina y similares.

10 En particular, el RLT soluble se puede unir a los fármacos antivirales para formar conjugados RLT soluble-fármaco a través de los medios conocidos en la técnica. La unión puede ser una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un RLT soluble con una fracción de fármaco. El engarce puede comprender un radical divalente como un alquileo, un arileno un heteroarileno, fracciones como:  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ ; unidades que se repiten de alquiloxi (p.ej. polietilenoxi, PEG, polimetileneoxi) y alquilamino (p.ej. polietilenoamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato, caproamida y similares.

15 La presente divulgación proporciona al menos una construcción que comprende el polinucleótido de la presente divulgación conectado operativamente con al menos un promotor. Las secuencias de codificación para las cadenas  $\alpha$ - y  $\beta$ - del RLT pueden estar conectadas operativamente con al menos un promotor funcional en el linfocito aislado. Dichos promotores adecuados pueden ser promotores constitutivos o inducibles, estando dentro del ámbito de la especialidad en la técnica la selección del promotor apropiado. Por ejemplo, los promotores adecuados pueden comprender, sin limitarse solo a ellos, el LTR retroviral, el promotor SV40, el promotor CMV y promotores celulares (p.ej. promotor de  $\beta$ -actina).

20 La presente divulgación proporciona también al menos un vector que comprende la construcción de acuerdo con la presente divulgación o el polinucleótido de acuerdo con la presente invención. En particular, los vectores pueden comprender, sin limitarse a ellos, vectores lentivirales, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados y vectores de virus herpes simple. Más en particular, se pueden utilizar vectores retrovirales para entregar las construcciones tanto *in vitro* como *in vivo* tal como se describe en los ejemplos.

25 La presente divulgación proporciona al menos un linfocito T que comprende el vector, la construcción o el péptido de acuerdo con la presente divulgación e invención.

30 La presente divulgación proporciona asimismo al menos un método para preparar al menos un linfocito T que comprende al menos un RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB para la entrega a al menos un sujeto que comprende la transducción de al menos un linfocito T aislado del sujeto con la construcción y/o el vector de la presente divulgación. La construcción y los vectores de acuerdo con la presente divulgación se pueden entregar a células *in vivo* o *in vivo* utilizando cualquiera de los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, si las células son *in vitro* o *ex vivo*, se pueden transformar o transducir de acuerdo con los protocolos convencionales, p.ej. los descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Sambrook and Russell, CSHL Press (2001). Los ejemplos de los métodos pueden comprender sin limitarse solo a ellos, procedimiento químico con  $CaCl_2$ , electroporación, y similares. En particular, las construcciones de acuerdo con la presente divulgación se pueden entregar a las células *in vivo*. Los métodos adecuados para la entrega de construcciones de polinucleótido son conocidos en la técnica y pueden comprender, pero sin limitarse a ellos, vectores virales, nanopartículas, partículas de oro, lipoplexos y/o poliplexos.

35 La presente divulgación proporciona al menos un método para preparar al menos un RLT exógeno reactivo contra el epítipo de VHB que comprende:

40 (a) aislar al menos un linfocito T reactivo contra epítipo de VHB de al menos un individuo expuesto a VHB que ha resuelto la infección VHB

(b) clonar al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos una cadena  $\alpha$  y/o  $\beta$  de al menos un receptor de linfocito T RLT reactivo contra el epítipo de VHB de la etapa (a);

45 (c) entregar la secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) a al menos una célula; e

(d) incubar la célula en condiciones adecuadas para la expresión del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB.

50 En particular, el linfocito T reactivo contra epítipo de VHB de la etapa (a) antes mencionado puede ser reactivo contra epítipo HBc18-27 y/o contra epítipo HBs370-7.

55 De acuerdo con uno de sus aspectos, la presente divulgación proporciona al menos una célula, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con todos los aspectos de la presente divulgación e invención, para su uso en el tratamiento de infección de VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

La presente divulgación proporciona al menos un método para el tratamiento de VHB y/o la inhibición de la reactivación de VHB en al menos un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de al menos una cantidad inmunoterapéuticamente eficaz de células, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente divulgación e invención.

5 Otra posible aplicación del enfoque de RLT-VHB redirigido es para pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC). La infección crónica con VHB constituye el factor de riesgo más importante para el desarrollo de dicho tumor hepático y frecuentemente tiene lugar la integración de ADN-VHB en hepatocitos en las células transformadas con el tumor. La terapia de CHC a través de quimioterapia convencional, radiación o extirpación quirúrgica presenta graves limitaciones. Los linfocitos T específicos de VHB tienen el potencial para reconocer y eliminar células CHC que expresan antígenos VHB y la transferencia adoptiva de linfocitos T redirigidos al RLT-VHB puede tener potencial para conseguir la regresión de CHC. Tales resultados se obtuvieron en carcinoma nasofaríngeo, un tumor que expresa la proteína de virus Epstein-Bar (VEB), de modo que la infusión de células CD8<sup>+</sup> específicas de VEB presentó unos resultados prometedores. Los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican RLT y/o células que comprenden al menos un RLT reactivo contra epítipo de VHB pueden por tanto ser útiles en el tratamiento de CHC.

La presente divulgación proporciona además al menos un método para el tratamiento de carcinoma hepatocelular relacionado con VHB en al menos un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de al menos una cantidad inmunoterapéuticamente efectiva de células, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquier de los aspectos de la presente divulgación y la invención.

Se pueden administrar adecuadamente a un sujeto los vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican RLT y/o células que comprenden al menos un RLT reactivo contra epítipo del VHB preparados tal como se ha descrito, para tratar afecciones o infección VHB crónica o aguda (incluyendo p.ej. carcinoma hepatocelular) en el sujeto.

Se puede administrar profilácticamente a al menos un sujeto las células que expresan RLT reactivos contra epítipo de VHB, los vectores que comprenden nucleótidos que codifican RLT reactivo contra epítipo de VHB y/o el polipéptido que codifica el RLT reactivo contra epítipo de VHB para inhibir la reactivación de infección VHB. En particular, se pueden administrar los vectores de la divulgación a las células de al menos un sujeto *ex vivo*. Más en particular, los modos de administración del polinucleótido y/o vectores virales serán aquellos que entreguen específicamente y/o predominantemente las secuencias de codificación de RLT a linfocitos T y/o células madre hematopoyéticas. En el caso de un vector retroviral, puede anticiparse que las dosis adecuadas estarán comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/10<sup>6</sup> células y aproximadamente 10 µg/10<sup>6</sup> células, como por ejemplo dentro del intervalo de aproximadamente 1 µg/10<sup>6</sup> células a aproximadamente 5 µg/10<sup>6</sup> células. Más en particular, dichas dosis pueden prevenir o reducir los síntomas relacionados con VHB en al menos un 50 % con respecto a los síntomas previos al tratamiento o con respecto a un control adecuado. El tratamiento con al menos un vector retroviral de acuerdo con la presente divulgación puede paliar o aliviar la infección VHB y/o al menos una afección asociada y/o puede reducir la incidencia de una progresión hacia afecciones asociadas con VHB crónicas, sin proporcionar una cura. En particular, se puede utilizar el tratamiento para curar o prevenir infección VHB crónica o aguda o una afección asociada, incluyendo carcinoma hepatocelular.

En particular, la cantidad de células que componen la cantidad inmunoterapéuticamente eficaz de células que se ha de administrar depende del sujeto tratado. Ésta puede depender, sin limitarse solo a ellos, de la capacidad del sistema inmune del individuo para montar la respuesta inmune mediada por RLT, la edad, el sexo y el peso del paciente, así como la gravedad de la afección que se trate. El número de variables con respecto a al menos un régimen de tratamiento o profiláctico del individuo puede ser extenso, siendo de esperar un considerable intervalo de dosis. En particular, las células pueden administrarse en al menos una cantidad comprendida entre 5 x 10<sup>5</sup> células/kg peso corporal y 1 x 10<sup>10</sup> células/kg peso corporal. Más en particular, se puede administrar entre 5 x 10<sup>6</sup> células/kg peso corporal y 1 x 10<sup>8</sup> células/kg peso corporal. La dosis máxima de células y/o vector viral que se administre al sujeto puede ser la dosis máxima que no cause efectos secundarios no deseables y/o intolerables. Pueden contemplarse también regímenes adecuados para la administración inicial y los tratamientos adicionales, que se podrán determinar con arreglo a los protocolos convencionales.

La presente divulgación proporciona al menos un uso de al menos una célula, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente invención y la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

Las formas de preparación de medicamento sólidas o líquidas adecuadas pueden ser por ejemplo granulados, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos; (micro) cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o soluciones inyectables en forma de ampollas, así como preparaciones de liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación se utilizan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes expansores, lubricantes,

aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes, tal como se ha descrito anteriormente. Los medicamentos pueden ser adecuados para su uso en diversos sistemas de administración de fármaco.

5 De acuerdo con uno de sus aspectos, la presente invención proporciona al menos un método *in vitro* para diagnosticar a al menos un sujeto que es capaz de resolver infección VHB, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar al menos una muestra de al menos un sujeto;

10 (b) detectar la presencia de al menos un polinucleótido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste al menos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, y/o un homólogo de las mismas; y/o

15 (c) detectar a presencia de al menos un polipéptido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, y/o un homólogo de las mismas;

en el que la presencia del polinucleótido y/o el polipéptido es indicativa de que el sujeto es capaz de resolver la infección VHB.

20 De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona al menos un método *in vitro* para el diagnóstico de al menos un sujeto que padece o está en riesgo de padecer infecciones VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar al menos una muestra de al menos un sujeto;

25 (b) detectar la presencia de al menos un polinucleótido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste al menos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, y/o un homólogo de las mismas; y/o

30 (c) detectar a presencia de al menos un polipéptido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, y/o un homólogo de las mismas;

35 en el que existe una correlación entre la ausencia del polinucleótido y/o el polipéptido y la probabilidad de que el sujeto padezca o esté en riesgo de padecer infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

40 En particular, la muestra de ensayo puede ser orina, sangre, suero, sudor, y/o muestras de fluido oral. Más en particular, la presencia de al menos un polinucleótido y/o polipéptido de la presente invención se puede determinar utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Algunos de dichos métodos pueden comprender, pero no se limitan a ellos, PCR en tiempo real, citometría de flujo, PCR y/o intensidad de fluorescencia media geométrica (IFM).

45 La presente divulgación proporciona también al menos un kit para detectar y/o tratar infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB, comprendiendo dicho kit al menos una célula, al menos un vector y/o al menos un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la divulgación. En particular, el kit puede comprender al menos un manual que facilite las instrucciones sobre el uso de dicho kit.

**Tabla 1. Secuencias de cadenas alfa 3 y beta 8 de RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB y péptidos mutantes del epítipo HBc 18-27 naturales.**

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR1 alfa 3 (WT)	AAAAC TAGTATAAACAATTTA	1
CDR2 alfa 3 (WT)	TTAATACGTTCAAATGAAAGAGAG	2
CDR3 alfa 3 (WT)	TGTGCTACGTGGCTCTCTGGTTCTGCAAGGCAAC TGACCTTT	3

ES 2 622 505 T3

RLT alfa 3 (WT)	ATGGAAACTCTCCTGGGAGTGTCTTTGGTGATTCT ATGGCTTCAACTGGCTAGGGTGAACAGTCAACAG GGAGAAGAGGATCCTCAGGCCTTGAGCATCCAG GAGGGTGAAAATGCCACCATGAACTGCAGTTACA AACTAGTATAAACAATTTACAGTGGTATAGACAA AATTCAGGTAGAGGCCTTGTCCACCTAATTTTAAT ACGTTCAAATGAAAGAGAGAAACACAGTGAAGA TTAAGAGTACGCTTGACACTTCCAAGAAAAGCA GTTCTTGTGATCACGGCTTCCCGGGCAGCAGA CACTGCTTCTACTTCTGTGCTACGTGGCTCTCTG GTTCTGCAAGGCAACTGACCTTTGGATCTGGGAC ACAATTGACTGTTTTACCTGATATCCAGAACCCTG ACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTG ATTCTCAAACAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCT GATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACAT	4
	GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTG GCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA ACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACC TTCTCCCGAGCCAGAAAAGTTCTGTGATGTCAA GCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAAC CTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCG AATCCTCCTCTGAAAGTGGCCGGTTTAATCTG CTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA	
CDR1 alfa 3 (OPT)	AAGACATCAATCAACAACCTTG	5
CDR2 alfa 3 (OPT)	CTGATTCCGGAGTAATGAGCGGGAA	6
CDR3 alfa 3 (OPT)	TGTGCTACATGGCTGAGTGGCAGCGCACGGCAAT TGACTTTT	7
RLT alfa 3 (OPT)	ATGGAGACCCTTCTGGGAGTGTCCCTCGTGATT TGTGGCTGCAGCTTGTCTGGGTGAATTCTCAGCA GGGCGAGGAAGACCCGAGGCCCTTAGCATTCA GGAAGGGGAGAACGCTACCATGAATTGCTCATA AAGACATCAATCAACAACCTTGCAGTGGTACCGTCA GAACTCTGGGAGAGGACTCGTGACCTGATCCTG ATTCGGAGTAATGAGCGGGAAAAACACTCTGGAA GGCTGAGGGTGACCCTCGATACCTCTAAAAAATC CTCCTCCCTGCTGATAACCGCCAGCAGGGCCGC CGACACCGCTTCTACTTCTGTGCTACATGGCTG AGTGGCAGCGCACGGCAATTGACTTTTGGGAGTG GCACTCAGCTGACAGTGTGCCCCGACATCCAGAA TCCAGATCCCGCAGTGTATCAGCTGAGAGACTCA AAGTCAAGTGACAAGAGTGTGTGCCTGTTCACTG ATTTTACTCTCAGACCAACGTCTCTCAGTCTAAG GACAGCGACGTTTACATCACTGACAAAAGTGTGC TGGACATGCGCAGTATGGACTTTAAATCAAATTCC GCCGTGGCTTGGAGCAATAAGTCTGACTTCGCCT GTGCTAATGCTTTTAATAACTCCATCATTCCGGAG GATACATTTTTCCCTAGCCCCGAGTCATCCTGCGA CGTGAAGCTGGTGGAGAAGTCATTCGAGACCGAC ACCAATCTTAACCTTTCAGAACCTGTCCGTTATCGG GTTTAGAATCCTGCTGCTGAAGGTTGCCGGATT AACCTGCTTATGACGTTGCGCCTGTGGTCCAGCT GA	8
CDR1 alfa 3	KTSINNL	9
CDR2 alfa 3	LIRSNERE	10
CDR3 alfa 3	CATWLSGSARQLTF	11
RLT alfa 3	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEG ENATMNCYSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSN EREKHSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFC ATWLSGSARQLTFGSGTQLTVLPDIQNPDPVAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTV LDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGF RILLKLVAGFNLLMTLRLWSS.	12
CDR1 beta 8 (WT)	ATT TCA GGA CAC GAC TAC CTT	13
CDR2 beta 8 (WT)	TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG ATA	14

ES 2 622 505 T3

CDR3 beta 8 (WT)	TGT GCC AGC AGC AAT CGG GCG AGC TCC TAC AAT GAG CAG TTC TTC	15
RLT beta 8 (WT)	ATGGACTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTT GCATCCTGGTAGCAAAGCACACAGATGCTGGAGT TATCCAATCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATG GGACAAGAAGTGA CTCTGAGATGTAAACCAATTC AGGACACGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACC ATGATGCGGGGACTGGAGTTGCTCATTACTTTAA CAACAACGTTCCGATAGATGATTCAGGGATGCC GAGGATCGATTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCAT CATTCTCCACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACC CAGGGACTCAGCTGTGACTTCTGTGCCAGCAGC AATCGGGCGAGCTCCTACAATGAGCAGTTCTTCG GGCCAGGGACACGGCTCACCGTGCTAGAGGACC TGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT TGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAA AAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCT ACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGA ATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAG ACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCC GCCCTCA ATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAG GGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAAC CACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCT CGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCA AACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG GGGTAGAGCAGACTGTGGCTTACCTCCGAGTCT TACCAGCAAGGGGTCTGTCTGCCACCATCCTCT ATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGATGC CGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGGCCATG GTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG	16
CDR1 beta 8(OPT)	ATC TCT GGG CAC GAC TAC CTG	17
CDR2 beta 8 (OPT)	TAT TTT AAT AAC AAT GTG CCT ATC	18
CDR3 beta 8 (OPT)	TGT GCC TCC TCC AAC CGG GCC TCC TCT TAT AAC GAG CAG TTC TTC	19
RLT beta 8 (OPT)	ATGGACAGCTGGACACTGTGCTGCGTGAGCCTGT GCATTCTGGTGGCCAAGCACACCCGACGCCGGCG TGATCCAGAGCCCTCGCCACGAGGTGACCGAAAT GGGCCAGGAGGTGACACTGCGCTGCAAGCCAA CTCTGGGCACGACTACCTGTTCTGGTACAGGCAG ACCATGATGAGGGGCTGGAAGTCTGATCTATT TTAATAACAATGTGCCTATCGATGACTCTGGCATG CCCGAGGACAGGTTCTCCGCCAAGATGCCAAC GCCAGCTTCTCCACCCTGAAGATCCAGCCCTCCG AACCTAGGGACTCCGCCGTGACTTCTGTGCCTC CTCCAACCGGGCCTCCTTATAACGAGCAGTTC TTCGGCCCTGGAACCCGCCTGACCGTGCTGGAG GACCTGAAAAATGTGTTTCCCCCGAGGTGGCCG TGTTTGAACCAAGCGAGGCCGAGATCAGCCACAC ACAGAAGGCCACCCTGGTGTCTGGCCACCGG ATTCTATCCCGATCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG GTGAACGGGAAGGAGGTGCACTCTGGCGTGAGC ACCGACCCTCAGCCACTGAAAGAGCAGCCCGCC CTGAATGATTCTCGTACTGCCTGTCCAGCCGCC TGCGCGTGTCTGCCACCTTCTGGCAGAACCCAG AAATCACTTCAGGTGCCAGGTGCAGTTCTATGG CTGAGCGAGAACGACGAATGGACCCAGGACAGA GCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCAAG CCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTTACCAGCG AGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCCGCCACAAT TCTGTACGAGATCCTGCTGGGAAAGGCCACACTG TACGCCGTGCTGGTGGAGCGCCCTGGTGTGATG GCCATGGTGAAGCGGAAAGACTCCCGGGGCTGA	20
CDR1 beta 8	SGHDYL	21
CDR2 beta 8	YFNNNVPI	22
CDR3 beta 8	CASSNRASSYNEQFF	23

RLT beta 8	MDSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMG QEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNN VPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYFCASSNRASSYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPF EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	24
Péptido HbC18-27 (genotipo A/D/E/F VHB) (C18-27 WT)	FLPSDFFPSV	25
Péptido HbC18-27 (genotipo B /C VHB) (27I)	FLPSDFFPSI	26
Variante natural 1	FLP <u>N</u> DFFPSV	27
Variante natural 2	FLP <u>N</u> DFFPSA	28
Variante natural 3	FLP <u>A</u> DFFPSI	29
Variante natural 4	FLP <u>V</u> DFFPSI	30
Variante natural 5	FLP <u>T</u> DYFPSV	31
Variante natural 6	FLPSDF <u>F</u> PPV	32
Variante natural 7 (26G)	FLPSDFF <u>P</u> GV	33
Variante natural 8 (25M, 26G)	FLPSDFF <u>M</u> GV	34
Variante natural 9 (23Y)	FLPSD <u>F</u> YFPSV	35
Variante natural 10 (24L)	FLPSD <u>F</u> LPSV	36
Variante natural 11 (21 P)	FL <u>P</u> PDFFPSV	37
Variante natural 12 (27A)	FLPSDFFPS <u>A</u>	38
Variante natural 13 (24Y)	FLPSD <u>F</u> YPSV	39

**Tabla 2. Secuencias de cadenas alfa 12 y beta 7,8 de RLT exógeno reactivo contra epítipo de VHB y péptidos mutantes de epítipo HBe 370-79 naturales**

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR1 alfa 12 (WT)	GAC CGA GGT TCC CAG TCC	40
CDR2 alfa 12 (WT)	ATA TAC TCC AAT GGT	41
CDR3 alfa 12 (WT)	TGT GCC GTG AAC CTC TAT GCA GGC AAC ATG CTC ACC TTT	42
RLT alfa 12 (WT)	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCT GTGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGGAGCCAACAG AAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTG TTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCAC TTACAGTGACCGAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGT ACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGATA ATGTTTCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGG AAGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAG TATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCCAG TGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAACCTC TATGCAGGCAACATGCTCACCTTTGGAGGGGGAA CAAGGTTAATGGTCAAACCCCATATCCAGAACCCT GACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAAT CCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGTTTT GATTCTCAAACAAATGTGTACAAAAGTAAGGATTC TGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACA TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGT GGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCA AACGCCCTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACAC CTTCTTCCCAGCCCAGAAAAGTTCTGTGATGTCA AGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAA CCTAAACTTTCAAACCTGTGAGTATTGGGTTCC GAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAACT GCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA	43
CDR1 alfa 12	DRGSQS	44
CDR2 alfa 12	IYSNG	45
CDR3 alfa 12	CAVNLYAGNMLTF	46

RLT alfa 12	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSV PEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMF IYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPDSA TYLCAVNLYAGNMLTFGGGTRLMVKPHIQNPDAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDVYIT DKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLNLS	47
	VIGFRILLKVGAFNLLMTLRLWSS	
CDR1 beta 7.8 (WT)	TCG GGT CAT GTA TCC	48
CDR2 beta 7.8 (WT)	TTC CAG AAT GAA GCT CAA	49
CDR3 beta 7.8 (WT)	TGT GCC AGC AGC TCG GAC TTT GGC AAT CAG CCC CAG CAT TTT	50
RLT beta 7.8 (WT)	ATGGGCACAGGCTCCTCTGCTGGGTGGTCTG GGTTTCTAGGGACAGATCACACAGGTGCTGGAG TCTCCCAGTCCCCTAGGTACAAAGTCGCAAAGAG AGGACAGGATGTAGCTCTCAGGTGTGATCCAATT TCGGGTCATGTATCCCTTTTTTGGTACCAACAGGC CCTGGGGCAGGGGCCAGAGTTTCTGACTTATTTT CAGAATGAAGCTCAACTAGACAAATCGGGGCTGC CCAGTGATCGCTTCTTTGCAGAAAGGCCTGAGGG ATCCGTCTCCACTCTGAAGATCCAGCGCACACAG CAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCA GCTCGGACTTTGGCAATCAGCCCCAGCATTGTTGG TGATGGGACTCGACTCTCCATCCTAGAGGACCTG AACAAGGTGTTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGG AGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAA GGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTC CCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAAT GGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGAC CCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCCGCCCTCAAT GACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGG GTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACC ACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTC GGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAA ACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG GGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGTCC TACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCT ATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGC TGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATG GTCAAGAGAAAGGATTTCTGA	51
CDR1 beta 7.8	SGHVS	52
CDR2 beta 7.8	FQNEAQ	53
CDR3 beta 7.8	CASSDFGNQPQHF	54
RLT beta 7.8	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVAKR GQDVALRCDPIGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQ NEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRTOQED SAVYLCASSDFGNQPQHFQDGTLSILEDLNKVF PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELS WVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPVNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF	55
Péptido HBs370-79 (genotipo A/D VHB)	SIVSPFIPLL	56
Péptido HBs370-79 (genotipo B VHB)	NILSPFMPLL	57
Péptido HBs370-79 (genotipo C VHB)	NILNPFLL	58

Una vez descrita la invención de forma general, se comprenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo, sin pretender con ello limitar la presente invención.

## 5 Ejemplos

Por lo general, se siguieron técnicas de biología molecular normales conocidas en la técnica que no se detallan de forma específica, tal como se describen en Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (2001).

Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el propósito de ayudar a comprender mejor la invención. Se pretende que los materiales y condiciones empleados en particular ilustren mejor la invención sin limitar el alcance razonable de las reivindicaciones adjuntas.

## 5 Ejemplo 1

### *Clonación de linfocito T específico de virus Hepatitis B para epítipo 18-27 del núcleo de VHB (HBc18-27)*

10 Se aislaron linfocitos de sangre periférica (LSP) de sangre fresca obtenida de un paciente VHB que había sido capaz de resolver la enfermedad y que era del haplotipo HLA HLA-A0201, que se denomina en el presente documento "paciente VHB HLA-A201 resuelto." En primer lugar, se heparinizó la sangre y se aislaron LSP aplicando centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque. A continuación, se lavaron los LSP tres veces en Solución Salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), se resuspendieron en medio Aim-V, 2 % suero humano AB (Invitrogen, Carlsbad, CA), se estimularon con 1  $\mu$ M de epítipo 18-27 de núcleo de VHB ("péptido HBc18-27"; FLPSDFFPSV; SEQ ID NO: 25; Primm SRL, Milán, Italia) más 20 U/ml interleucina-2- (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se colocaron en una placa de 24 pocillos a  $4 \times 10^6$  células/pocillo durante 10 días.

20 A continuación, se marcaron los linfocitos CD8<sup>+</sup> específicos de HBc18-27 preparados según lo anterior con pentámeros HLA-A2 clase I conjugados con ficoeritrina (PE) denominados en el presente documento "pentámeros HLA-A201 HBc18-27" y/o "pentámero HLA-A2" (Proimmune, Oxford, Reino Unido) que contenían el HBc18-27 durante 30 min a 37 °C y se purificó por separación magnética utilizando microperlas anti-PE (Miltenyi Biotech, Surrey, Reino Unido). Tras el aislamiento, se marcaron las células con anti-CD8<sup>+</sup> conjugado con Cychrome (BD Pharmingen, San Diego, CA) y se determinó el porcentaje de linfocitos T teñidos por análisis de separación de células activada por fluorescencia (FACS) utilizando un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San Diego, CA) y se analizó utilizando el software CellQuest (BD Biosciences). El método de citometría de flujo utilizado se describe con mayor profundidad en Gehring *et al.* En la Figura 2A se muestran los resultados.

30 A continuación, se clonaron los linfocitos T pentámero HLA-A201 HBc18 positivos y CD8<sup>+</sup> utilizando el ensayo de dilución limitante descrito en "Current Protocols in Immunology" Copyright © 2007 de John Wiley and Sons, Inc., y se expandieron en Aim-V 2 % suero AB (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, y 10 ng/ml IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN) con 1,5  $\mu$ g/ml fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) utilizando LSP irradiados alogeneicos como células de alimentación. Se colocaron las células en placas de 96 pocillos a 1 célula/pocillo y se sometieron a ensayo los pocillos con un crecimiento positivo de células T para determinar la reactividad contra HBc18-27 por teñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$  de acuerdo con el protocolo proporcionado por in Gehring *et al.*

40 A continuación se exploraron los pocillos altamente positivos para reactividad con péptido utilizando el pentámero HLA-A201 específico de HBc18-27 (Proimmune, Oxford, Reino Unido) y se seleccionó para el estudio posterior un clon de linfocito T denominado en el presente documento C183. Los resultados representados en la Figura 2 A demuestran que se detectó el 100 % de los linfocitos T reactivos contra el pentámero HLA-A201 HBc18-27 y CD8<sup>+</sup>. Se sometió a ensayo la clonalidad utilizando un panel de anticuerpos monoclonales V $\beta$  del receptor de linfocitos T (RLT) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Este procedimiento supuso el uso de un panel de anticuerpos V $\beta$  que tiñeron todos los miembros de la familia de cadena V $\beta$  conocidos, significando el teñido positivo para solamente una cadena V $\beta$  que fue muy probable que todos los linfocitos T de ese clon expresaran el mismo RLT. En consecuencia, 45 la distribución V $\beta$  del RLT resultante para C183, que se muestra en la Figura 2B, demuestra que todos los linfocitos T de C183 eran V $\beta$ 8 positivos, lo que indica homogeneidad (es probable que se derivaran todos ellos de una única célula) y por lo tanto clonalidad.

50 Por tanto, se demostró que C183 era un clon de linfocito T citotóxico específico de HBc18-27, CD8<sup>+</sup>, clónico y se desarrolló y se mantuvo en Aim-V, 2 % suero AB, 20 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, y 10 ng/ml IL-15 (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) en una incubadora humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C.

## Ejemplo 2

### 55 *Reconocimiento de células tumorales y hepatocitos humanos primarios por el clon de linfocito T C183*

HepG2 es una línea de células tumorales de tipo hepatocito HLA-A2+, aisladas de un tumor de carcinoma hepatocelular (CHC) primario. Se cultivaron células HepG2 (American Type Culture Collection, Rockford, MD) y se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF), 20 mM HEPES, 0,5 mM piruvato sódico, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomina, aminoácidos MeM, L-glutamina, aminoácidos no esenciales MeM (Invitrogen, Carlsbad, CA), y 5  $\mu$ g/ml Plasmocina (InvivoGen, San Diego, CA) para prevenir la contaminación por micoplasmas. Se obtuvo por ingeniería genética un derivado de esta línea, HepG2.105 (suministrado amablemente por Michael Nassal en la Universidad de Freiberg) para que expresara el genoma completo del VHB bajo el control de un regulador dependiente de doxiciclina, que permite que se exprese el antígeno viral a varios niveles, tal como se describe en Sun and Nassal, 2006. Se transfeció establemente una línea celular parental de control de vector, HepG2TA2-7 (suministrada amablemente por Michael Nassal en la Universidad

de Freiberg) con el regulador dependiente de doxiciclina, pero sin el genoma de VHB. Se cultivaron ambas líneas celulares HepG2.105 y HepG2TA2-7 en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10 % tetraciclina- SBF aprobado (BD Biosciences, San Diego, CA), 20 mM HEPES, 0,5 mM piruvato sódico, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, aminoácidos no esenciales MeM (Invitrogen), 200 µg/ml sulfato G418, 80 µg/ml Higromicina B (AutogenBioclear, Wiltshire, Reino Unido). Se añadió doxiciclina (0,1 a 100 ng/ml, BD Biosciences) a los cultivos para regular la expresión de VHB.

Se marcaron las células HepG2 normales con 0,75 µM carboxifluoresceín succinimidil éster (CFSE; Invitrogen) durante 10 min a 37 °C. Se lavaron las células y se pulsaron las dianas marcadas con CFSE con 10<sup>-8</sup> M de péptido HBc18-27 (Primm SRL, Milán, Italia) durante 1 h sobre hielo. Se mezclaron las células HepG2 sin marcar (0 M péptido HBc18-27) y marcadas con CFSE (más péptido HBc18-27) en una relación 1:1, 2 x 10<sup>5</sup> células de cada línea de células HepG2, en placas de 24 pocillos y se incubaron durante toda la noche para permitir la adhesión de HepG2. Para determinar si C183 era capaz de eliminar las células tumorales de CHC, se co-cultivaron los clones C183 obtenidos del Ejemplo 1 con las células HepG2 que se habían adherido a los pocillos ("dianas"). Se adhirió un total de 4 x 10<sup>5</sup> de clones C183 a las dianas y se incubaron durante 5 h a 37 °C. La relación del efector resultante (C183):diana (células HepG2 sin marcar + marcadas con CFSE) fue 1:1. Al cabo de 5 h de co-incubación, se recogieron las células HepG2 por tripsinización y se determinó la citotoxicidad comparando la relación entre las dianas pulsadas con péptido y las dianas sin pulsar en pocillos +/- la adición de C183. Los resultados que se muestran en la Figura 3 demuestran gráficamente que las células CFSE negativas (sin péptido HBc18-27) que se co-cultivaron con C183 permanecieron y prácticamente todas las células HepG2 que fueron HBc18-27 y CFSE positivas fueron eliminadas por C183 tal como se muestra en la última columna. Los resultados indican que el clon de linfocito T citotóxico específico de HBc18-27, C183, fue capaz de eliminar las células tumorales que presentan péptidos de VHB.

Asimismo, para determinar si C183 puede reconocer antígeno procesado endógenamente presentado por células CHC, se co-cultivo C183 con HepG2.105 o la línea de control HepG2TA2-7 y, a continuación, se determinó la producción de citocinas y la degranulación citotóxica (teñido CD107a+), una medida indirecta de eliminación. Se sembraron 1 x 10<sup>5</sup> células de HepG2.105 y de la línea celular HepG2TA2-7 por separado en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche para dar cabida a la adhesión de HepG3. Para los ensayos de degranulación citotóxica, se añadió primero anticuerpo CD107a-PE (BD Pharmingen, San Diego) a todos los pocillos antes de añadir un total de 1 x 10<sup>5</sup> de clones C183 a cada pocillo al que se había adherido HepG2.105 o la línea de control HepG2TA2-7 y se incubó durante 5 h a 37 °C. La relación del efector resultante (C183):diana (HepG2.105 o línea de control HepG2TA2-7) fue 1:1. Tras la incubación, se recogieron linfocitos T C183, se lavaron y se tiñeron con anti-CD8+ conjugado con Cychrome (BD Pharmingen, San Diego, CA), a continuación, se permeabilizaron y se fijaron utilizando Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego) con arreglo a las instrucciones del fabricante. Se lavaron las células y se incubaron con anticuerpo IFN-γ anti-humano conjugado con PE (R&D Systems) durante 30 min sobre hielo; a continuación, se lavaron y se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo FACScan (BD BioEP Sciences, San Diego, CA) y se analizaron utilizando un software CellQuest (BD Biosciences). El método de citometría de flujo utilizado se describe con mayor profundidad en Gehring *et al.*

Tal como se muestra en la Figura 4A, C183 no respondió a la línea celular de control HepG2TA2-7 que era VHB negativa. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 4B, el co-cultivo de C183 con células HepG2.105 que expresan VHB, estimularon la producción de IFN-γ y degranulación, lo que indica que el clon C183 reconoció el epítipo HBc18-27 procesado endógenamente y presentado por células de carcinoma hepatocelular.

Para determinar si el clon de linfocito T C183 puede responder a hepatocitos infectados de forma natural, se aislaron hepatocitos primarios desde hígados explantados VHB crónico HLA-A2<sup>+</sup> o HLA-A2<sup>-</sup> y se co-cultivaron con C183 según el procedimiento que se describe a continuación.

Se obtuvo tejido de hígado de pacientes VHB crónicos tanto HLA-A2<sup>+</sup> como HLA-A2<sup>-</sup> explantados bajo consentimiento informado de acuerdo con las directrices éticas y morales de la institución. Se recogieron secciones de tejido en medio E de William (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) y se mantuvo a 4°C durante un máximo de 2 h antes del aislamiento de la célula. Se aislaron hepatocitos por perfusión con enzimas descrita para su uso con hígado humano por Strain *et al.* (Strain, Ismail *et al.* 1991) con algunas modificaciones. Brevemente, se cortó una sección de hígado de aproximadamente 100 a 200 g y se introdujo una cánula en los vasos expuestos sobre una sola superficie con tubos de un diámetro interno de 3 mm. Se perfundió el tejido sucesivamente a 50 ml/min con 500 ml de solución de lavado PBS-HEPES para eliminar el medio E de William, 500 ml PBS-HEPES-0,5 mM EGTA y de nuevo con 500 ml de solución de lavado PBS-HEPES. (Se obtuvieron las soluciones de Invitrogen Ltd.). Finalmente, se perfundió con 300 ml de solución de enzima (0,05 % colagenasa (Roche, Indianapolis, IN), 0,012 % hialuronidasa (Sigma, Dorset, Reino Unido), 0,025 % Dispasa II (Roche), 0,005 % ADNasa (Roche) que contenía 5 mM CaCl<sub>2</sub>), se mantuvo a 41 °C, se perfundió con recirculación y se continuó la digestión enzimática durante 10 a 20 min hasta que se juzgó que el hígado se había ablandado sustancialmente. Se disoció mecánicamente el tejido en 200 ml de solución salina equilibrada de Hank (Invitrogen Ltd.) que contenía 10 % SBF, 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Se filtró la suspensión celular a través de un filtro de células de 60 µm y se aglomeró a 37x g durante 10 min a 4 °C. Se lavaron las células tres veces en solución salina equilibrada de Hank, tras lo cual se evaluó la viabilidad y el rendimiento. Se utilizaron los hepatocitos purificados inmediatamente después del aislamiento. Se añadieron 100.000 hepatocitos

primarios/pocillo a placas de 96 pocillos y se añadieron 75.000 clones C183 a los correspondientes pocillos durante 5 h con anticuerpo anti-CD107a-PE (BD Pharmingen, San Diego) para degranulación más 10 µg/ml brefeldina A (Sigma-Aldrich). Tras la incubación, se recogieron los linfocitos T, se lavaron y se teñieron con anti-CD8<sup>+</sup> conjugado con Cy-chrome (BD Pharmingen, San Diego, CA), a continuación, se permeabilizaron y se fijaron empleando Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego) con arreglo a las instrucciones del fabricante. Se lavaron las células y se incubaron con anticuerpo IFN-γ anti-humano conjugado con FITC (R&D Systems, Abingdon, RU) durante 30 min sobre hielo, a continuación, se lavaron y se analizaron por citometría de flujo empleando el citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San Diego, CA) y se analizaron utilizando software CellQuest (BD Biosciences). El método de citometría de flujo se describe con mayor profundidad en Gehring *et al.*

Los resultados de la Figura 5 muestran que C183 descargó gránulos citotóxicos, medidos por tñido con CD107a como respuesta a hepatocitos primarios infectados con VHB HLA-A2 positivos, pero no a hepatocitos infectados con VHB HLA-A2 negativos o hepatocitos sin infectar HLA-A2<sup>+</sup>, lo que indica que C183 puede reconocer hepatocitos humanos primarios infectados de forma natural.

### Ejemplo 3

#### *Reconocimiento de subtipos HLA-A2 adicionales y variantes de péptidos*

La infección VHB crónica constituye un problema predominantemente en Asia y por tanto es importante saber si el RLT específico de HBc18-27 puede reconocer subtipos de HLA-A2 que dominan en la población asiática. VHB tiene un total de cinco genotipos (A, B, C, D y G). El epítipo HBc18-27 expresado por los genotipos B y C de VHB (FLPSDFFPSI; SEQ ID NO: 26) son los más prevalentes en Asia. Los genotipos A y D, prevalentes sobre todo en Europa y en Estados Unidos (FLPSDFFPSV; SEQ ID NO: 25), se caracterizan por una valina en la posición 27 mientras que los genotipos B y C se caracterizan por una isoleucina en la posición 27. Esto puede tener un profundo impacto en la capacidad de los pacientes VHB de presentar el epítipo HBc18-27 o puede afectar al reconocimiento del RLT del epítipo.

Se determinó la capacidad de C183 de reconocer el epítipo HBc18-27 desde los genotipos B y C, y A y D presentados por diversos subtipos de la familia HLA-A2 CMH clase I utilizando linfocitos B transformados con un virus Epstein Barr (VEB) con subtipos conocidos de HLA-A2. (suministrado amablemente por el Profesor Chan Soh Ha en el Centro de Investigación y Formación en Inmunología de la OMS, Singapur). En este procedimiento se pueden emplear linfocitos B transformados con VEB desde cualquier otra fuente. Se cargaron linfocitos B transformados con VEB (10<sup>5</sup> células/pocillo) con concentraciones crecientes (1 pM - 1000 pM) de péptido HBc18-27 o bien de genotipos A/D de VHB o bien de genotipos B/C de VHB durante 1 h a 25 °C (genotipo A/D de VHB = FLPSDFFPSV; Primm SRL; genotipo B/C de VHB = FLPSDFFPSI, Genscript, Piscataway, NJ). Se lavaron los linfocitos B VEB con HBSS para eliminar el exceso de péptido y se co-cultivaron con 7,5 x 10<sup>4</sup> de C183 durante 5 h en presencia de 10 µg/ml brefeldina A. Se midió la producción de IFN-γ por tñido de citocina intracelular para determinar la activación de linfocitos T tal como se describe en Gehring *et al.*

En la Figura 6 se muestran los resultados. Los resultados muestran la capacidad de C183 de reconocer el epítipo HBc18-27 de cuatro genotipos de VHB diferentes (A, B, C y D) y que los epítipos HBc18-27 fueron presentados por los tres subtipos de HLA-A2 más dominantes (HLA-A201, HLA-A206, y HLA-A207). La respuesta de los linfocitos T C183 se representa en el gráfico cómo % de células IFN-γ<sup>+</sup>. Las barras negras representan la frecuencia de linfocitos T C183 IFN-γ<sup>+</sup> capaces de responder al epítipo HBc18-27 de los genotipos A/D de VHB (C18-V), mientras que las barras grises representan la frecuencia de los linfocitos T C183 capaces de responder al epítipo HBc18-27 de los genotipos B/C de VHB (C18-I). Los datos muestran que los epítipos HBc18-27 presentados por moléculas CMH clase I (A) HLA-A201; (B) HLA-A206; y (C) HLA-A207 fueron reconocidos por C183. C183 reconoció el epítipo HBc18-27 con una alta sensibilidad (≤ 1 pM) desde todos los genotipos y el epítipo fue reconocido prácticamente de igual forma por los tres subtipos HLA-A2 más dominantes (A) A0201, (B) A0206 and (C) A0207.

Para demostrar mejor que los linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 reconocieron el epítipo HBc18-27 presentado por múltiples subtipos de HLA-A2 y varios mutantes del epítipo HBc18-27, se cargaron linfocitos B transformados con VEB que expresaban los subtipos HLA-A201, -A0206 o -A0207 con concentraciones crecientes de epítipo HBc18-27 de los genotipos A/D de VHB (La Figura 12 (A)) y epítipo HBc18-27 de los genotipos B/C de VHB (La Figura 12 (B)) (en la Tabla 1 se facilita la secuencia) y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 durante 5h. Se midió la activación de linfocitos T por tñido de citocina intracelular para determinar el IFN-γ. Los resultados tal como se muestra en las Figuras 12 (A) y (B) demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT de HBc-18-27 reconocen el epítipo HBc18-27 presentado por múltiples subtipos de HLA-A2.

La Figura 12 (C) muestra los resultados obtenidos cuando se cargaron linfocitos T2 HLA-A2<sup>+</sup> con cada uno de los péptidos mutantes del epítipo HBc18-27 y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 durante 5 h. Se determinó el reconocimiento de linfocitos T de los péptidos mutantes por tñido de citocina intracelular para IFN-γ. En la Tabla 1 se facilitan las secuencias de los péptidos mutantes. Tal como se puede observar de los resultados, los linfocitos T transducidos con el RLT HBc-18-27 reconocieron varios mutantes del epítipo HBc18-27. Sin estimar 1 Sin estimar 2 se refieren al control en el que no se cargaron linfocitos T2 HLA-A2<sup>+</sup> con ningún péptido.

Ejemplo 4*Aislamiento de ADN de cadena alfa y beta del receptor de linfocitos T C183*

- 5 Se aisló ARN total de  $5 \times 10^6$  clones C183 utilizando TRIzol (Invitrogen). Se llevó a cabo la clonación de la cadena alfa y beta del RLT sobre la base de un contrato de Primm SRL (Milán, Italia) y se suministraron en un vector de clonación II como para la clonación en dirección 3'.

10 El análisis de la secuencia puso de manifiesto la presencia de una cadena beta del RLT, V $\beta$ 8.2, y una cadena alfa del RLT, V $\alpha$ 3 en C183. Un posterior análisis de la secuencia de ADN utilizando el algoritmo Immunogenetics V-Quest algorithm ([http://imgt.cines.fr/IMGT\\_vquest/share/textes/](http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/)) identificó 3 únicas regiones determinantes de complementariedad (CDR) en la cadena V $\alpha$ 3 (CDR1 $\alpha$ : SEQ ID NO: 9, CDR2 $\alpha$ : SEQ ID NO: 10, CDR3 $\alpha$ : SEQ ID NO: 11) y tres únicas CDR en la cadena V $\beta$ 8.2 (CDR1 $\beta$ : SEQ ID NO: 21, CDR2 $\beta$ : SEQ ID NO: 22, CDR3 $\beta$ : SEQ ID NO: 23).

15 Ejemplo 5

*Construcciones retrovirales que contienen RLT específico de HBc18-27 (RLT HBc18-27) y transducción de linfocito*

20 Se clonaron ADNc V $\alpha$ 3 RLT y V $\beta$ 8.2 RLT preparados según el Ejemplo 4 anterior individualmente en el vector retroviral MP71 tal como se describe en Engels, Cam et al. 2003. (suministrado amablemente por el Profesor Hans Stauss, Royal Free and UCL Medical School, Londres, RU) utilizando sitios 5' Not-1 y 3' BsrG1 (New England Biolabs, Ipswich, MA). Se digirieron V $\alpha$ 3 del RLT, V $\beta$ 8.2 y el vector MP71 durante 1 h a 37 °C con 10 U de cada enzima. Se aislaron los productos digeridos sobre 1 % de gel de agarosa por electroforesis y se purificaron utilizando un equipo de extracción con gel Qiagen. Se mezclaron en una relación 1:1 las cadenas del RLT y el vector MP71 y se ligaron durante toda la noche a 4 °C con ADN ligasa de T4 (Promega) para formar construcciones retrovirales MP71- V $\alpha$ 3 RLT y MP71- V $\beta$ 8.2 RLT. Se secuenciaron estas construcciones para confirmar que el inserto de ADN era correcto.

30 Para determinar la expresión y función del RLT clonado, se utilizaron las construcciones para la preparación de sobrenadante retroviral que se utilizó posteriormente para la transducción de linfocitos T tal como se explica más adelante. La expresión de las cadenas alfa y beta insertadas fue activada por repeticiones terminales largas (RTL) encontradas en cada construcción. Se prepararon los sobrenadantes retrovirales utilizando un método de transfección transitoria que comprendió el uso de una línea celular de empaquetamiento anfotrópica Phoenix (Clontech Laboratories, EE.UU.) que se colocó primero en placa a  $2 \times 10^6$  células/disco y se dejó adherirse durante 24 h en medio de Dulbecco modificado con Iscove (IMDM), 10 % SBF, 25 mM HEPES, Glutamax (Invitrogen) y 5  $\mu$ g/ml Plasmocina (Invivogen). Se co-transfectaron transitoriamente las células utilizando el método CaCl<sub>2</sub> durante 24 h con 9 mg de cada uno de MP71- V $\alpha$ 3 RLT, MP71- V $\beta$ 8.2 RLT en combinación con 6  $\mu$ g de envoltura anfotrópica (suministrada amablemente por el Profesor Hans Stauss, Royal Free and UCL Medical School, Londres, RU). A continuación se reemplazó IMDM por Aim-V 2 % suero humano AB y se cultivaron las células phoenix durante 24 h más antes de recoger los sobrenadantes retrovirales para transducción.

45 Se utilizaron linfocitos de sangre periférica (LSP) de un donante sano y un paciente VHB crónico para determinar la expresión y funcionalidad del RLT HBc18-27 clonado. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios bajo consentimiento informado por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll. Se estimularon PBMC con 600 U/ml interleukin-2 (ILEP 2; R&D Systems) y 50 ng/ml anti-CD3 (OKT-3; eBioscience, San Diego, CA) durante 48 h. Se recubrieron las placas de cultivo de tejido de 24 pocillos sin tratar con 30  $\mu$ g/ml Retronectin (Takara Bio, Otsu Shiga, Japón) durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron los pocillos con HBSS y se bloquearon con PBS 2 % BSA durante 30 min. Se recogieron los linfocitos, se lavaron, se hizo el recuento y se colocaron en placa  $5 \times 10^5$  células en pocillos recubiertos con retronectina, y se mezclaron con los sobrenadantes retrovirales recogidos tal como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron células de transducción simulada incluidas como control negativo, con el sobrenadante de células Phoenix que no habían sido transfectadas con vectores retrovirales. Se añadió IL-2 a los pocillos hasta una concentración final de 600 U/ml. Se incubaron los linfocitos durante 24 h en el sobrenadante retroviral, periodo tras el cual se reemplazó el medio por Aim-V 2 % suero human AB más 100 U/ml IL-2. Se cultivaron durante 3 días más las células transducidas y las de transducción simulada. Al cabo de 3 días, se midió la expresión de RLT en la superficie celular tanto de las células transducidas con RLT como de las células de transducción simulada por tinte inmunofluorescente. Se cuantificaron el tinte CD8-PE-Cy7 (BD Biosciences), la expresión de V $\beta$ 8-PE (Beckman Coulter) y el pentámero HLA-A201-HBc18-PE (Proimmune) por citometría de flujo. Se realizó la citometría de flujo sobre células teñidas utilizando un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences), y se analizaron los datos con el programa FACs Diva (BD Biosciences).

65 Tal como se muestra en la Figura 7A, la expresión de V $\beta$ 8 aumentó significativamente en los linfocitos transducidos con RLT HBc18-27 en comparación con las células de transducción simulada, que expresaron únicamente niveles endógenos de V $\beta$ 8. Se observó expresión de V $\beta$ 8 en linfocitos tanto CD8<sup>+</sup> como CD8<sup>-</sup>. Para unir apropiadamente el pentámero se necesita la interacción cooperativa de una cadena alfa y beta introducida correctamente apareada, así como el co-receptor CD8. Los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 CD8<sup>+</sup> se unieron a pentámeros HLA-

A201 HBc18-27, lo que indica que se había expresado también la cadena del RLT Va3 y que se había apareado correctamente el RLT introducido sobre la superficie de la célula de los linfocitos transducidos (La Figura 7B).

5 En la Figura 7 (C), se confirma la eficiencia de la transducción del RLT HBc18-27 en la que se muestra la frecuencia media de linfocitos T  $V\beta 8^+$  de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>+</sup> (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5  
 10 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>-</sup> (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml). La Figura 7 (D) que presenta la frecuencia media de linfocitos T pentámero A201<sup>+</sup> específicos de HBc18-27 de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>+</sup> (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>-</sup> (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml) confirma que el RLT HBc18-27 transducido se apareó correctamente y se unió a pentámeros HLA-A201 HBc18-27. Estos datos demuestran que los linfocitos T tanto de donantes sanos como de pacientes VHB pudieron transducirse con el RLT HBc18 con una eficacia similar.

### Ejemplo 6

#### 15 *Función de linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27*

Para confirmar que el RLT HBc18-27 era funcional, se utilizaron linfocitos T2 HLA-A2 positivos (American Type Culture Collection (Rockford, MD)) para estimular linfocitos T1 transducidos con RLT HBc18-27 y de transducción simulada. Se cultivaron linfocitos T2 en RPMI 1640 suplementado con 10 % suero bovino fetal inactivado con calor (SBF), 20 mM HEPES, 0,5 mM de piruvato sódico, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, aminoácidos MeM, Glutamax, aminoácidos no esenciales MeM (Invitrogen Ltd) y 5 µg/ml Plasmocina (InvivoGen, San Diego, CA). Se pulsaron los linfocitos T2 con 1 µg/ml de péptido HBc18-27 durante 1 h y después se lavaron para eliminar el exceso de péptido.

25 Para estimular linfocitos transducidos con RLT HBc18-27, denominados aquí linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27, preparados según el ejemplo 5, se co-cultivaron los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 y de transducción simulada durante toda la noche con los dos tipos de linfocitos T2 diferentes (pulsados con péptido HBc18-27 y sin pulsar) a 37 °C con 2 µg/ml brefeldina A. A continuación se lavaron los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 y de transducción simulada y se tiñeron con anti-CD8-PE-Cy7 (BD Pharmingen, San Diego, CA), se  
 30 fijaron y se permeabilizaron utilizando cytofix/cytoperm (BD Biosciences) con arreglo a las instrucciones del fabricante. A continuación se tiñeron los linfocitos T para determinar TNF-α-Alexa 488, IL-2-PE e IFN-γ-APC (BD Biosciences) durante 30 min sobre hielo. Se lavaron las células y se analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACs Canto (BD Biosciences) y se analizaron los datos con el programa FACs Diva (BD Biosciences).

35 Los resultados se muestran en la Figura 8A. Los linfocitos T de transducción simulada no produjeron citocinas (es decir, IFN-γ, TNF-α o IL-2) en presencia o ausencia de epítipo HBc18-27. Los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 no respondieron a linfocitos T2 en ausencia de péptido (La Figura 8A, fila 1) pero produjeron IFN-γ, TNF-α e IL-2 como respuesta a los linfocitos T2 cargados con péptido HBc18-27 (La Figura 8A, fila 3) lo que indica que el RLT HBc18-27 fue funcional cuando se expresó en linfocitos T primarios. Asimismo, el RLT HBc18-27 introducido fue funcional tanto en linfocitos CD8<sup>-</sup> (linfocitos CD4<sup>+</sup>) como CD8<sup>+</sup>, expandiendo su potencial utilidad para inmunoterapia ya que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> T proporcionan IL-2 adicional para mantener la supervivencia de linfocitos T y ligandos co-estimuladores como CD40L, que tiene el potencial de estimular las respuestas de linfocitos B.

45 La Figura 8 (B) muestra que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 de pacientes VHB crónicos son igualmente funcionales que los linfocitos T transducidos de donantes sanos. Se muestra la frecuencia media de linfocitos IFN-γ, TNF-α e IL-2 positivos, tal como se observa en la Figura 8A, de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>+</sup> (ADN VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>-</sup> (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml). Los resultados demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27-A201 se hacen multifuncionales con  
 50 frecuencias similares de linfocitos citocina positivos en cada grupo de pacientes.

### Ejemplo 7

#### *Afinidad de linfocitos transducidos con RLT de HBc18-27*

55 Dado el posible menor nivel de expresión del RLT HBc18-27 introducido, es posible que los linfocitos T obtenidos por ingeniería genética pudieran tener una menor afinidad para el epítipo viral real en comparación con el clon de linfocito T original, C183. Para someter a ensayo esta hipótesis se pulsaron linfocitos T2 HLA-A2 positivos (American Type Culture Collection, Rockford, MD) con péptido HBc18-27 a concentraciones comprendidas entre 1 fg/ml y 1 µg/ml con arreglo al protocolo descrito en el Ejemplo 6. Se co-cultivaron los linfocitos T2 cargados con péptido con linfocitos T transducidos con RLT de 5 donantes sanos, 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>+</sup> (AND VHB > 10<sup>7</sup> copias/ml), y 5 pacientes VHB crónicos HBeAg<sup>-</sup> (ADN VHB < 10<sup>6</sup> copias/ml) y el clon de linfocito T original C183 durante 5 h. Se midió la activación de linfocito T por tinte de citocina intracelular para IFN-γ. Los resultados se presentan como el porcentaje de respuesta IFN-γ máxima ya que la frecuencia de linfocitos transducidos con RLT  
 65 HBc18-27 varió entre los pacientes, mientras que C183 fue siempre 100 % específico para el epítipo HBc18-27. Los

resultados mostraron que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 CD8<sup>+</sup> presentaron una afinidad idéntica a la de C183 hasta 1 pg/ml (La Figura 9A).

5 En el mismo ensayo, se determinó la afinidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> transducidos con RLT HBc18-27. Los linfocitos específicos de HBc18-27 CD8<sup>-</sup> fueron considerados linfocitos T CD4<sup>+</sup> ya que fueron capaces de responder al epítipo HBc18-27 de forma específica de antígeno y dependiente de la dosis. Los linfocitos T transducidos con RLT de HBc18-27 CD4<sup>+</sup> presentaron una afinidad ligeramente menor en comparación con C183. Es probable que la diferencia en la afinidad al epítipo viral entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> se deba a la unión del co-receptor CD8<sup>+</sup> que estabiliza la interacción RLT con la molécula HLA-A2. El correceptor CD8<sup>+</sup> está ausente en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y por tanto se reduce ligeramente la afinidad, si bien son todavía altamente sensibles.

### Ejemplo 8

#### *Optimización de codón de secuencia de ADN del RLT HBc18-27*

15 Debido a la presencia de redundancia en el código genético, la mayoría de los aminoácidos pueden estar codificados para múltiples codones, que se usan con diferentes frecuencias y eficiencias dentro de los organismos y que pueden tener como resultado realmente una traducción de proteínas menos eficiente. Dada la variación genética y los eventos de recombinación que tienen lugar durante el desarrollo de linfocitos T, el ADN que codifica el RLT HBc18-27 puede estar compuesto de codones que no se traducen óptimamente en los seres humanos. Por lo tanto, se realizó la optimización de codón para las cadenas V $\beta$ 8.2 y V $\alpha$ 3 del RLT HBc18 para dar como resultado una expresión más eficiente del RLT de HBc18-27 y una mayor sensibilidad y función (Service by Genscript, Piscataway, NJ).

25 Se clonaron V $\alpha$ 3 y V $\beta$ 8.2 con codones optimizados individualmente en el vector MP71 utilizando sitios de enzima de restricción 5'Not-1 y 3'BsrG1 tal como se ha descrito anteriormente. Para confirmar que el RLT de codón optimizado, denominado en el presente documento RLT HBc18-Opt, era capaz de ser expresado, se transdujeron LSP con las construcciones de RLT HBc18-Opt-V $\alpha$ 3 y RLT HBc18-Opt-V $\beta$ 8.2, tal como se ha descrito anteriormente. Para el RLT de tipo silvestre de HBc18-27 denominado en el presente documento RLT HBc18-WT, se transdujeron también LSP con HBc18-WT-V $\beta$ 8.2 (MP71-RLT V $\beta$ 8.2 del ejemplo 7) y HBc18-WT-V $\alpha$ 3 (MP71-RLT V $\alpha$ 3 del ejemplo 7) para comparar. Se analizaron los LSP transducidos con HBc18-27 para determinar la expresión de V $\beta$ 8 y la capacidad de unirse a pentámeros HLA-A201 HBc18 (Proimmune, Oxford, Reino Unido) por citometría de flujo 3 días después de la transducción. Los resultados demuestran que la frecuencia de linfocitos T V $\beta$ 8<sup>+</sup> era similar entre los LSP transducidos con RLT HBc18-Opt (21,5 %) y los linfocitos transducidos con RLT HBc18-WT (21,1 %) (La Figuras 30 35 10A).

Se midió la cantidad de V $\beta$ 8 expresado en los linfocitos transducidos con RLT HBc18-Opt y los linfocitos transducidos con RLT HBc18-WT por intensidad de fluorescencia media (IFM) utilizando el software FACs Diva software (BD Biosciences) (La Figura 10B). Se sustrajeron los valores de isotipo para determinar la IFM específica. El resultado demostró que la cantidad de V $\beta$ 8 expresado fue prácticamente idéntico tanto en los linfocitos transducidos con RLT HBc18-Opt como en los linfocitos transducidos con RLT HBc18 (La Figura 10B).

Para determinar la capacidad de unión de pentámeros HLA-A201 HBc18, se marcaron los linfocitos transducidos con RLT HBc18-Opt y los linfocitos transducidos con RLT HBc18-WT con un anti-CD8-PE-Cy7 (BD Pharmingen, San Diego, CA) y pentámeros HLA-A201 HBc18 (Proimmune, Oxford, Reino Unido). Se determinaron los porcentajes de linfocitos teñidos por análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando un citómetro de flujo FACs Canto (BD Biosciences, San Diego, CA) y se analizaron utilizando un software FACs Diva software (BD Biosciences). Los resultados demostraron que la frecuencia de linfocitos pentámero HLA-A201 HBc18 positivos fue el doble de alta en los linfocitos transducidos con RLT HBc18-Opt que en los RLT HBc18-WT (La Figura 10C), lo que indica que la cadena V $\alpha$ 3 se puede expresar con mayor eficacia a partir de la construcción de codón optimizado en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Dado que el teñido de V $\beta$ 8 fue equivalente es probable que la mayor unión de pentámero en la Figura 10A esté relacionada con una mejor expresión de la cadena V $\alpha$ 3 para aumentar la expresión de los RLT HBc18-27 correctamente apareados en la superficie de la célula.

55 Una vez confirmado que el RLT HBc18-Opt se expresó apropiadamente en los linfocitos T transducidos, los autores de la invención sometieron a ensayo la funcionalidad del RLT HBc18-Opt en comparación con el RLT HBc18-WT. Se estimularon durante toda la noche linfocitos T del RLT HBc18-Opt y RLT HBc18-WT o de transducción simulada con linfocitos T2 HLA-A2 positivos en presencia o ausencia de péptido HBc18-27 más 2  $\mu$ g/ml brefeldina A con arreglo al protocolo descrito en el Ejemplo 6. A continuación, se marcaron los linfocitos T con anti-CD8 PE-Cy7 (BD Pharmingen, San Diego, CA) y se fijaron y se permeabilizaron utilizando cytofix/cytoperm con arreglo a las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). A continuación, se tiñeron las células con anti-IFN- $\gamma$ -APC (BD Biosciences) durante 30 min sobre hielo y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  de linfocitos T por citometría de flujo.

65 Los resultados demuestran que se produjo un aumento de casi el doble en la frecuencia de linfocitos T IFN- $\gamma$  positivos transducidos con el RLT HBc18-Opt en comparación con los linfocitos T transducidos con el RLT de HBc18-WT (La Figura 11). Los linfocitos de transducción simulada fueron negativos en presencia y ausencia del

péptido HBc18-27. Por lo tanto, existe una correlación entre el aumento de células pentámero positivas y un aumento de células funcionales capaces de responder a las dianas cargadas con péptido.

#### Ejemplo 9

5 *Linfocitos T transducidos con RLT Hbc18-27 eliminan líneas celulares CHC que expresan endógenamente proteínas VHB o están cargadas con el péptido VHB 18-27.*

10 Se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 de cada grupo de pacientes (sanos, HBeAg(-), HBeAg(+)) con células HepG2 marcadas con DiOC que expresaban el genoma de VHB completo ((VHB-HepG2) o la línea celular de control parental (Ctrl-HepG2) en una relación Efector:diana de 1:1 durante 6 h en presencia de yoduro de propidio (PI). Los linfocitos T diana coloreados fueron DiOC+/PI+. Se excluyeron los linfocitos T del análisis por tñido con anti-CD11a-APC (BD Bioscience). Los resultados son representativos de 3 experimentos. Se consideraron linfocitos T efectores las células IFN- $\gamma$ + /CD8+ por tñido de citocina intracelular tras la estimulación con linfocitos T2 pulsados con péptido. Los resultados tal como se muestran en la Figura 13 (A) demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 de donantes sanos y pacientes VHB crónicos pueden eliminar las líneas celulares CHC que expresan endógenamente proteínas VHB. Esto indica que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18 pudieron reconocer las células tumorales de pacientes que expresan el antígeno del núcleo de VHB.

20 Para determinar si los linfocitos T transducidos con RLT podían eliminar múltiples líneas celulares CHC HLA-A2+, se cargaron líneas celulares CHC marcadas con DiOC (se obtuvieron HepG2 de ATCC; SNU-387, se obtuvieron SNU-368 de banco de líneas celulares coreano) con concentraciones crecientes de péptidos de HBc18-27 y se co-cultivaron con linfocitos T transducidos con RLT HBc-18-27 RLT en una relación de Efector a diana de 1:1 durante 6 h en presencia de yoduro de propidio (PI). Los linfocitos T diana coloreados fueron DiOC+/PI+. Se excluyeron linfocitos T del análisis por tñido con anti-CD11a-APC (BD Bioscience). Los resultados son representativos de 3 experimentos. Se consideró que los linfocitos T efectores eran células IFN- $\gamma$ + /CD8+ por tñido de citocina intracelular después de la estimulación con linfocitos T2 pulsados con péptido. Los resultados, tal como se muestra en la Figura 13 (B) demuestran que los linfocitos T transducidos con RLT HBc18-27 fueron capaces de eliminar múltiples líneas celulares CHC HLA-A2+.

#### Ejemplo 10

35 *Clonación de linfocitos T específicos del virus de Hepatitis B para epítipo 370-79 de la envoltura del VHB (HBs370-79)*

Se aislaron linfocitos de sangre periférica (LSP) y se prepararon según el método del Ejemplo 1 y se estimularon con 1  $\mu$ M de epítipo 370-79 de la envoltura del VHB ("péptido HBs370-79"; SIVSPFIPLL; SEQ ID NO: 56; Primm SRL, Milán, Italia) más 20 U/ml interleucina-2- (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se colocaron en placa en una placa de 24 pocillos a 4 x 10<sup>6</sup> células/pocillo durante 10 días.

40 Se enriquecieron los linfocitos T CD8+ específicos de HBs370-79 utilizando ensayo de captura de IFN- $\gamma$  con arreglo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Surrey, Reino Unido).

45 A continuación, se clonaron los linfocitos T específicos HBs370-79 IFN- $\gamma$ + utilizando el ensayo de dilución limitante tal como se describe en "Current Protocols in Immunology" Copyright © 2007 de John Wiley and Sons, Inc., y se expandieron en Aim-V 2 % suero AB (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, and 10 ng/ml IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN) con 1,5  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) utilizando LSP irradiados alogénicos como células de alimentación. Se colocaron en placa las células a 1 célula /pocillo sobre placas de 96 pocillos y se sometieron a ensayo los pocillos con un crecimiento positivo de linfocitos T para determinar la reactividad contra HBs370-79 por tñido de citocina intracelular para IFN- $\gamma$  con arreglo al protocolo facilitado en Gehring *et al.* Se seleccionó para posterior estudio el clon de linfocito T denominado en el presente documento E10-1 D.

50 Se cultivó el clon de linfocito T citotóxico específico de HBs370-79 E10-1 D y se mantuvo en Aim-V, 2 % suero AB, 20 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, y 10 ng/ml IL-15 (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) en un incubador humidificado con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C.

#### Ejemplo 11

60 *Afinidad y Función de linfocitos T transducidos con RLT específicos de HBs370-79 y reconocimiento de péptidos variantes según genotipo*

65 Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos en el Ejemplo 6 con linfocitos T transducidos con RLT específicos de HBs370-79. El clon de linfocitos T E10-1D o los linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 reconocen linfocitos T2 HLA-A2+ cargados con el epítipo HBs370-79. Se cargaron linfocitos T2 con concentraciones crecientes de péptido HBs370-79 y se co-cultivaron con E10-1D o linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79

durante 5 h y se tiñeron para IFN- $\gamma$ . Los datos se presentan como porcentaje de respuesta máxima para normalizar la frecuencia diferencial de cada línea. Los resultados, tal como se muestran en la Figura 14 (A) demuestran que el RLT específico de HBs370-79 es funcional, pero que los linfocitos T transducidos con RLT HBs370 tuvieron una afinidad más baja que el clon de linfocito T original E10-1D.

5 Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos en el ejemplo 3 con linfocitos T transducidos con RLT específicos de HBs370-79. Los linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 reconocen variantes de genotipo del epítipo HBs370-79 (En la Tabla 2 se facilitan las secuencias de las variantes de genotipo). Se co-cultivaron linfocitos T transducidos con RLT HBs370-79 con linfocitos T2 HLA-A2<sup>+</sup> cargados con 1  $\mu$ g/ml péptido de cada genotipo durante 5 horas y se evaluó la activación marcado CD107a y teñido para IFN- $\gamma$ . Las secuencias del genotipo A y D son idénticas. Los resultados, tal como se muestran en la Figura 14 (B) demuestran que RLT específico de HBs370-79 reconoce las variantes genotípicas del epítipo HBs370-79.

15 Referencias:

Engels, B., H. Cam, et al. (2003). "Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes." *Hum Gene Ther* 14(12): 1155-68.  
 Gehring A.J et al. (2007). The Level of Viral Antigen Presented by Hepatocytes Influences CD8 T cell Function. *J Virol.*; 81(6): 2940-2949.  
 20 Karlin S. and Altschul S.F, (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*; 87(6): 2264-2268.  
 Maini, M. and Bertolotti A (2006) "The effect of pathogens on the immune system: Viral hepatitis". In *immunodominance: The choice of the Immune System*, J.A. Frelinger, ed (Weinheim: Wiley-VCH).  
 25 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Sambrook and Russell, CSHL Press (2001).  
 Schumacher et. al., (2002), *Nat Rev. Immunol*, Vol 2: 512.  
 Strain, A. J., et al. 1991. Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest* 87:1853-7.  
 30 Sun, D. and M. Nassal (2006). "Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus." *J Hepatol* 45(5): 636-45.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> A\*STAR  
 Agency for Science Technology and Research

<120> Receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB y usos del mismo

40 <130> FP4671

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.4

45 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena alfa 3 de TCR de tipo silvestre

55 <400> 1

aaaactagta taaacaattt a  
 21

60 <210> 2  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 622 505 T3

<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena alfa 3 de TCR de tipo silvestre

<400> 2

ttaatacgtt caaatgaaag agag  
24

5

<210> 3

<211> 42

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc\_feature

<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena alfa 3 de TCR de tipo silvestre

15

<400> 3

tgtgctaagt ggcctctctgg ttctgcaagg caactgacct tt  
42

20

<210> 4

<211> 822

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> Misc\_feature

<223> Cadena alfa de TCR de tipo silvestre

30

<220>

<221> Misc\_feature

<223> Cadena alfa 3 de TCR de tipo silvestre

<400> 4

ES 2 622 505 T3

atggaaaactc tcctgggagt gtctttggtg attctatggc ttcaactggc tagggatgaac  
60

agtcaacagg gagaagagga tcctcaggcc ttgagcatcc aggagggatga aaatgccacc  
120

atgaactgca gttacaaaac tagtataaac aatttacagt ggtatagaca aaattcaggt  
180

agaggccttg tccacctaat ttttaatacgt tcaaatgaaa gagagaaaca cagtgggaaga  
240

ttaagagtca cgcttgacac ttccaagaaa agcagttcct tgttgatcac ggcttcccg  
300

gcagcagaca ctgcttctta cttctgtgct acgtggctct ctggttctgc aaggcaactg  
360

acctttggat ctgggacaca attgactggt ttacctgata tccagaacct tgacctgcc  
420

gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatatt  
480

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact  
540

gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa  
600

tctgactttg catgtgcaaa cgcttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc  
660

cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag ctggctgaga aaagcttga aacagatagc  
720

aacctaaact ttcaaacct gtcagtgatt gggttccgaa tcctctcct gaaagtggcc  
780

gggtttaatc tgetcatgac gctgaggctg tggctcagct ga  
822

5 <210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena alfa 3 de TCR optimizado  
<400> 5

aagacatcaa tcaacaactt g  
21

15 <210> 6  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20

# ES 2 622 505 T3

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena alfa 3 de TCR optimizado

5 <400> 6

ctgattcggg gtaatgagcg ggaa  
24

10 <210> 7  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena alfa 3 de TCR optimizado

<400> 7

20 tgtgctacat ggctgagtgg cagcgcacgg caattgactt tt  
42

25 <210> 8  
<211> 822  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena alfa 3 de TCR optimizado

<400> 8

ES 2 622 505 T3

atggagacc ttctgggagt gtcctctgtg attctgtggc tgcagcttgc tcgggtgaat  
60

tctcagcagg gcgaggaaga cccgcaggcc cttagcattc aggaagggga gaacgctacc  
120

atgaattgct catacaagac atcaatcaac aacttgcagt ggtaccgtca gaactctggg  
180

agaggactcg tgcacctgat cctgattcgg agtaatgagc gggaaaaaca ctctggaagg  
240

ctgaggggtga ccctcgatac ctetaaaaaa tcctcctccc tgctgataac cgccagcagg  
300

gccgccgaca ccgcttccta cttctgtgct acatggctga gtggcagcgc acggcaattg  
360

acttttggga gtggcaactca gctgacagtg ctgcccgaca tccagaatcc agatcccgca  
420

gtgtatcagc tgagagactc aaagtcaagt gacaagagtg tgtgcctggt cactgatttt  
480

gactctcaga ccaacgtctc tcagtctaag gacagcgacg tttacatcac tgacaaaact  
540

gtgctggaca tgcgcagtat ggactttaa tcaaattccg ccgtggcttg gagcaataag  
600

tctgacttgc cctgtgctaa tgcttttaat aactccatca ttccggagga tacatttttc  
660

cctagccccg agtcatcctg cgacgtgaag ctgggtggaga agtcattcga gaccgacacc  
720

aatcttaact ttcagaacct gtccgttatc gggtttagaa tcctgctgct gaaggttgcc  
780

ggattcaacc tgcttatgac gttgcgctg tggccagct ga  
822

5 <210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena alfa 3  
de TCR

<400> 9

15 Lys Thr Ser Ile Asn Asn Leu  
1 5

20 <210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

# ES 2 622 505 T3

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena alfa 3 de TCR  
5  
<400> 10  
  
Leu Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu  
1 5  
  
10 <210> 11  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
15 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena alfa 3 de TCR  
  
20 <400> 11  
  
Cys Ala Thr Trp Leu Ser Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe  
1 5 10  
  
25 <210> 12  
<211> 273  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
30 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena alfa 3 de TCR  
  
<400> 12

ES 2 622 505 T3

Met Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Ala Arg Val Asn Ser Gln Gln Gly Glu Glu Asp Pro Gln Ala Leu Ser  
20 25 30

Ile Gln Glu Gly Glu Asn Ala Thr Met Asn Cys Ser Tyr Lys Thr Ser  
35 40 45

Ile Asn Asn Leu Gln Trp Tyr Arg Gln Asn Ser Gly Arg Gly Leu Val  
50 55 60

His Leu Ile Leu Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu Lys His Ser Gly Arg  
65 70 75 80

Leu Arg Val Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys Ser Ser Ser Leu Leu Ile  
85 90 95

Thr Ala Ser Arg Ala Ala Asp Thr Ala Ser Tyr Phe Cys Ala Thr Trp  
100 105 110

Leu Ser Gly Ser Ala Arg Gln Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu  
115 120 125

Thr Val Leu Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu  
130 135 140

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe  
145 150 155 160

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile  
165 170 175

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn  
180 185 190

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala  
195 200 205

ES 2 622 505 T3

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu  
 210 215 220

Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr  
 225 230 235 240

Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu  
 245 250 255

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser  
 260 265 270

Ser

5 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena beta 8 de TCR de tipo silvestre  
 <400> 13

atttcaggac acgactacct t  
 21

15 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena beta 8 de TCR de tipo silvestre

25 <400> 14

tactttaaca acaacgttcc gata  
 24

30 <210> 15  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena beta 8 de TCR de tipo silvestre  
 <400> 15

40 tgtgccagca gcaatcgggc gagctcctac aatgagcagt tcttc  
 45

<210> 16  
 <211> 942

ES 2 622 505 T3

<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena beta 8 de TCR de tipo silvestre

<400> 16

atggactcct ggaccctctg ctgtgtgtcc ctttgcctcc tggtagcaaa gcacacagat  
60

gctggagtta tccaatcacc ccggcacgag gtgacagaga tgggacaaga agtgactctg  
120

agatgtaaac caatttcagg acacgactac cttttctggg acagacagac catgatgogg  
180

ggactggagt tgctcattta cttaacaac aacgttccga tagatgattc agggatgccc  
240

gaggatcgat tctcagctaa gatgcctaata gcatcattct ccactctgaa gatccagccc  
300

tcagaacca gggactcagc tgtgtacttc tgtgccagca gcaatcgggc gagctcctac  
360

aatgagcagt tcttcggggc agggacacgg ctcaccgtgc tagaggacct gaaaaacgtg  
420

ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaaag  
480

gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccocgacc acgtggagct gagctgggtg  
540

gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag  
600

10 cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc  
660

tggcagaacc cccgcaacca ctctccgctgt caagtccagt tctacgggct ctccggagaat  
720

gacgagtggg cccaggatag ggccaaacct gtcaccagca tcgtcagcgc cgaggcctgg  
780

ggtagagcag actgtggett cacctccgag tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc  
840

atcctctatg agatcttgcg agggaaggcc accttgtatg ccgtgctggt cagtgccttc  
900

gtgctgatgg ccattggtcaa gagaaaggat tccagaggct ag  
942

15 <210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

# ES 2 622 505 T3

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena beta 8 de TCR optimizado

5 <400> 17

atctctggggc acgactacct g  
21

10 <210> 18  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena beta 8 de TCR optimizado

<400> 18

tattttaata acaatgtgcc tatc  
24

20

<210> 19  
<211> 45  
<212> ADN  
25 <213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena beta 8 de TCR optimizado

30

<400> 19

tgtgcctcct ccaaccgggc ctctcttat aacgagcagt tcttc  
45

35 <210> 20  
<211> 942  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena beta 8 de TCR optimizado

45 <400> 20

ES 2 622 505 T3

atggacagct ggacactgtg ctgcgtgagc ctgtgcattc tgggtggccaa gcacaccgac  
60

gccggcgtga tccagagccc tcgccacgag gtgaccgaaa tggggccagga ggtgacactg  
120

cgctgcaagc caatctctgg gcacgactac ctgttctggg acaggcagac catgatgagg  
180

ggcctggaac tgctgatcta ttttaataac aatgtgccta tccgatgactc tggcatgccc  
240

gaggacaggt tctccgccc gatgcccac gccagcttct ccaccctgaa gatccagccc  
300

tccgaacctt gggactccgc cgtgtacttc tgtgcctcct ccaaccgggc ctctctttat  
360

aacgagcagt tcttcggccc tggaaccgc ctgaccgtgc tggaggacct gaaaaatgtg  
420

ttccccccg aggtggccgt gtttgaacca agcggaggcc agatcagcca cacacagaag  
480

gccaccctgg tgtgtctggc caccggattc tatcccgatc acgtggagct gagctggtgg  
540

gtgaacggga aggaggtgca ctctggcgtg agcaccgacc ctcagccact gaaagagcag  
600

cccgcctga atgattctcg gtactgcctg tccagccgcc tgcgcgtgtc tgccaccttc  
660

tggcagaacc ccagaaatca cttcaggtgc caggtgcagt tctatgggct gagcgagAAC  
720

gacgaatgga cccaggacag agccaagcct gtgacacaga tccgtgtctgc cgaagcctgg  
780

ggcagagccg actgcccgtt taccagcgag agctaccagc agggcgtgct gtccgccaca  
840

attctgtacg agatcctgct gggaaaggcc aactgtacg ccgtgctggt gagcgccttg  
900

gtgctgatgg ccatggtgaa gcggaaagac tcccggggct ga  
942

<210> 21  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> Misc\_feature  
10 <223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena beta 8 de TCR

<400> 21

ES 2 622 505 T3

Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu  
1 5

5 <210> 22  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena beta 8 de TCR  
<400> 22

Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile  
1 5

15 <210> 23  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena beta 8 de TCR  
25 <400> 23

Cys Ala Ser Ser Asn Arg Ala Ser Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe  
1 5 10 15

30 <210> 24  
<211> 313  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

35 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena beta 8 de TCR  
<400> 24

ES 2 622 505 T3

Met Asp Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala  
 1 5 10 15

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
 50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 100 105 110

Ser Ser Asn Arg Ala Ser Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly  
 115 120 125

Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu  
 130 135 140

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys  
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu

ES 2 622 505 T3

					165					170					175
Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr
			180					185					190		
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr
		195					200					205			
Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro
	210					215					220				
Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn
225					230					235					240
Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser
				245					250						255
Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr
			260					265						270	
Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly
		275					280					285			
Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala
	290					295					300				
Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly							
	305				310										

- <210> 25
- <211> 10
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- <220>
- <221> Misc\_feature
- 10 <223> Epitopo HBc18-27 (Genotipo A/D/E/F); (WT C18-27)
- <400> 25

Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val
1				5					10

- 15 <210> 26
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- 20 <220>
- <221> Misc\_feature
- <223> Epitopo HBc18-27 (Genotipo B/C); 271

ES 2 622 505 T3

<400> 26

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile  
1 5 10

5 <210> 27  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Variante natural 1 de epítipo HBc18-27

<400> 27

15 Phe Leu Pro Asn Asp Phe Phe Pro Ser Val  
1 5 10

20 <210> 28  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

25 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Variante natural 2 de epítipo HBc18-27

<400> 28

Phe Leu Pro Asn Asp Phe Phe Pro Ser Ala  
1 5 10

30 <210> 29  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

35 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Variante natural 3 de epítipo HBc18-27

40 <400> 29

Phe Leu Pro Ala Asp Phe Phe Pro Ser Ile  
1 5 10

45 <210> 30  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

50 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Variante natural 4 de epítipo HBc18-27

<400> 30

55 Phe Leu Pro Val Asp Phe Phe Pro Ser Ile  
1 5 10

ES 2 622 505 T3

<210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 5  
 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 5 de epítopo HBc18-27  
 10 <400> 31  
                   Phe Leu Pro Thr Asp Tyr Phe Pro Ser Val  
                   1                  5                  10  
 15 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 20 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 6 de epítopo HBc18-27  
 <400> 32  
                   Phe Leu Pro Ser Asp Phe Tyr Pro Pro Val  
                   1                  5                  10  
 25 <210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 30 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 7 de epítopo HBc18-27; 26G  
 35 <400> 33  
                   Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Gly Val  
                   1                  5                  10  
 40 <210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 45 <220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 8 de epítopo HBc18-27; 25M, 26G  
 50 <400> 34  
                   Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Met Gly Val  
                   1                  5                  10  
 55 <210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 <220>

ES 2 622 505 T3

<221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 9 de epítopo HBc18-27; 23Y

<400> 35

5

Phe Leu Pro Ser Asp Tyr Phe Pro Ser Val  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

10

<220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 10 de epítopo HBc18-27; 24L

15

<400> 36

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Leu Pro Ser Val

1 5 10

20

<210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

25

<220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 11 de epítopo HBc18-27; 21P

30

<400> 37

Phe Leu Pro Pro Asp Phe Phe Pro Ser Val  
 1 5 10

35

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

40

<220>  
 <221> Misc\_feature  
 <223> Variante natural 12 de epítopo HBc18-27; 27A

<400> 38

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ala  
 1 5 10

45

<210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B

50

<220>

# ES 2 622 505 T3

<221> Misc\_feature  
<223> Variante natural 13 de epítopo HBc18-27; 24Y

<400> 39

5

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Tyr Pro Ser Val  
1 5 10

<210> 40  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena alfa 12 de TCR de tipo silvestre

15

<400> 40

gaccgaggtt cccagtcc  
18

20

<210> 41  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

25

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena alfa 12 de TCR de tipo silvestre

30

<400> 41

atatactcca atggt  
15

35

<210> 42  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena alfa 12 de TCR de tipo silvestre

<400> 42

tgtgccgtga acctctatgc aggcaacatg ctcaccttt  
39

45

<210> 43  
<211> 825  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

50

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena alfa 12 de TCR de tipo silvestre

55

<400> 43

ES 2 622 505 T3

atgatgaaat ccttgagagt ttactagtg atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg  
60

agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttccaga gggagccatt  
120

gcctctctca actgcactta cagtgaccga ggttcccagt ccttctctg gtacagacaa  
180

tattctggga aaagccctga gttgataatg ttcataact ccaatggtga caaagaagat  
240

ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac  
300

tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtga acctctatgc aggcaacatg  
360

ctcacctttg gagggggaac aagggttaatg gtcaaaccctc atatccagaa cctgacctc  
420

gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcacgat  
480

tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa  
540

actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac  
600

aaatctgact ttgcatgtgc aaagccttc aacaacagca ttattccaga agacacctc  
660

ttcccagcc cagaaagttc ctgtgatgtc aagctggctg agaaaagctt tgaaacagat  
720

acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg  
780

gccgggttta atctgctcat gacgctgagg ctgtgggtcca gctga  
825

<210> 44  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena alfa 12 de TCR

10

<400> 44

Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
1 5

15

<210> 45  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 622 505 T3

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena alfa 12 de TCR

5 <400> 45

Ile Tyr Ser Asn Gly  
1 5

10 <210> 46  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena alfa 12 de TCR

<400> 46

20 Cys Ala Val Asn Leu Tyr Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe  
1 5 10

<210> 47  
<211> 274  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena alfa 12 de TCR

30 <400> 47

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro



ES 2 622 505 T3

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
260 265 270

Ser Ser

5 <210> 48  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena beta 7.8 de TCR de tipo silvestre  
<400> 48

15 tcgggtcatg tatcc  
15

20 <210> 49  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

25 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena beta 7.8 de TCR de tipo silvestre  
<400> 49

30 ttccagaatg aagctcaa  
18

35 <210> 50  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena beta 7.8 de TCR de tipo silvestre  
<400> 50

45 tgtgccagca gctcggactt tggcaatcag cccagcatt tt  
42

50 <210> 51  
<211> 933  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena beta 7.8 de TCR de tipo silvestre  
<400> 51

ES 2 622 505 T3

atgggcacca ggctcctctg ctgggtggtc ctgggtttcc tagggacaga tcacacaggt  
60

gctggagtct cccagtcctc taggtacaaa gtcgcaaaga gaggacagga tgtagctctc  
120

aggtgtgata caatttcggg tcatgtatcc cttttttggg accaacaggc cctggggcag  
180

gggccagagt ttctgactta tttccagaat gaagctcaac tagacaaatc ggggctgccc  
240

agtgatcgct tctttgcaga aaggcctgag ggatccgtct ccactctgaa gatccagcgc  
300

acacagcagg aggactccgc cgtgtatctc tgtgccagca gctcggactt tggcaatcag  
360

ccccagcatt ttggtgatgg gactcgactc tccatcctag aggacctgaa caaggtgttc  
420

ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc  
480

acactgggtg gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg  
540

aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggacctgc agccctcaa ggagcagccc  
600

gcctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg  
660

cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac  
720

gagtggacc caggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcgga ggctgggggt  
780

agagcagact gtggctttac ctccggtgtcc taccagcaag gggctctgtc tgccaccatc  
840

ctctatgaga tctgtctagg gaaggccacc ctgtatgctg tgctggtcag cgccttctgt  
900

ttgatggcca tggcaagag aaaggatttc tga  
933

<210> 52  
<211> 5  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> Misc\_feature  
10 <223> Región Determinante de Complementariedad 1 (CDR1) para cadena beta 7.8 de TCR

<400> 52

ES 2 622 505 T3

Ser Gly His Val Ser  
1 5

5 <210> 53  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 2 (CDR2) para cadena beta 7.8 de TCR  
  
<400> 53

Phe Gln Asn Glu Ala Gln  
1 5

15 <210> 54  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Región Determinante de Complementariedad 3 (CDR3) para cadena beta 7.8 de TCR  
  
25 <400> 54

Cys Ala Ser Ser Ser Asp Phe Gly Asn Gln Pro Gln His Phe  
1 5 10

30 <210> 55  
<211> 310  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

35 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Cadena beta 7.8 de TCR  
  
<400> 55

ES 2 622 505 T3

Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Val Val Leu Gly Phe Leu Gly Thr  
 1 5 10 15

Asp His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Val Ala  
 20 25 30

Lys Arg Gly Gln Asp Val Ala Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Val Ser Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe  
 50 55 60

Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro  
 65 70 75 80

Ser Asp Arg Phe Phe Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala  
 100 105 110

Ser Ser Ser Asp Phe Gly Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr  
 115 120 125

Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val  
 130 135 140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala  
 145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu

ES 2 622 505 T3

```

                    165                    170                    175
Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
    180                    185                    190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
    195                    200                    205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg
    210                    215                    220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp
    225                    230                    235                    240

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala
    245                    250                    255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln
    260                    265                    270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
    275                    280                    285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met
    290                    295                    300

Val Lys Arg Lys Asp Phe
    305                    310

```

- <210> 56
- <211> 10
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- <220>
- <221> Misc\_feature
- 10 <223> Epitopo HBe370-79 (Genotipo A/D)

<400> 56

```

Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu
    1         5         10

```

- 15 <210> 57
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Virus de la hepatitis B
- 20 <220>
- <221> Misc\_feature
- <223> Epitopo HBc18-27 (Genotipo B)

ES 2 622 505 T3

<220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Epítopo HBe370-79 (Genotipo B)

5 <400> 57

Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu  
1 5 10

10 <210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Virus de la hepatitis B

15 <220>  
<221> Misc\_feature  
<223> Epítopo HBe370-79 (Genotipo C)

<400> 58

20 Asn Ile Leu Asn Pro Phe Leu Pro Leu Leu  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un linfocito T aislado que comprende al menos un receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB y/o un fragmento del mismo, en donde el epítipo de VHB es restringido a HLA-A2 y es:
- 5 el epítipo HBc18-27 que comprende SEQ ID NO: 25 y/o SEQ ID NO: 26; y/o el epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58;
- 10 y en donde el fragmento comprende un sitio activo que permite que el receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB reconozca el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79.
2. El linfocito T aislado según la reivindicación 1, en el que el receptor de linfocito T exógeno comprende:
- 15 al menos una cadena  $\alpha$  que comprende las secuencias:
- (a) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, y/o mutantes de la misma; y/o  
(b) SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, y/o mutantes de la misma; y/o
- 20 al menos una cadena  $\beta$  que comprende las secuencias:
- (a) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 y/o mutantes de la misma; y/o  
(b) SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y/o mutantes de la misma,
- 25 en donde el mutante conserva la capacidad de unirse y activar el epítipo de VHB.
3. El linfocito T aislado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el receptor de linfocito T exógeno comprende:
- 30 (a) al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma y/o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24 o un fragmento de la misma; y/o  
(b) al menos una cadena  $\alpha$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 47 o un fragmento de la misma y/o al menos una cadena  $\beta$  que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 55 o un fragmento de la misma,
- 35 en donde el fragmento comprende un sitio activo que permite que el receptor del linfocito T exógeno reconozca el epítipo HBc18-27 y/o el epítipo HBs370-79.
- 40 4. Un polinucleótido aislado que comprende al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\alpha$  y/o al menos una secuencia que codifica al menos una cadena  $\beta$ , en donde la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  son de al menos un receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB, en donde el epítipo de VHB es restringido a HLA-A2, y es el epítipo HBc18-27 que comprende SEQ ID NO: 25 y/o SEQ ID NO: 26; y/o epítipo HBs370-79 que comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56 a 58.
- 45 5. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 17, al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 18 y al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19.
- 50 6. El polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en donde la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.
- 55 7. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la cadena  $\alpha$  tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8 y la cadena  $\beta$  tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20.
- 60 8. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la secuencia que codifica la cadena  $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y/o la secuencia que codifica la cadena  $\beta$  comprende SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.
- 65

9. El polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 4 u 8, en donde la cadena  $\alpha$  del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 43 y la cadena  $\beta$  del receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 51.

- 5
10. Un polipéptido aislado que comprende:
- (a) una cadena  $\alpha$  que comprende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y/o una cadena  $\beta$  que comprende SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; y/o
  - 10 (b) una cadena  $\alpha$  que comprende SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y/o una cadena  $\beta$  que comprende SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54;

en donde el polipéptido es al menos un receptor de linfocito T exógeno reactivo contra epítipo de VHB y el epítipo de VHB es restringido a HLA-A2.

- 15
11. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 10 en el que:
- (a) la cadena  $\alpha$  tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 12 y la cadena  $\beta$  tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 24; y/o
  - 20 (b) la cadena  $\alpha$  tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 47 y la cadena  $\beta$  tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 55.

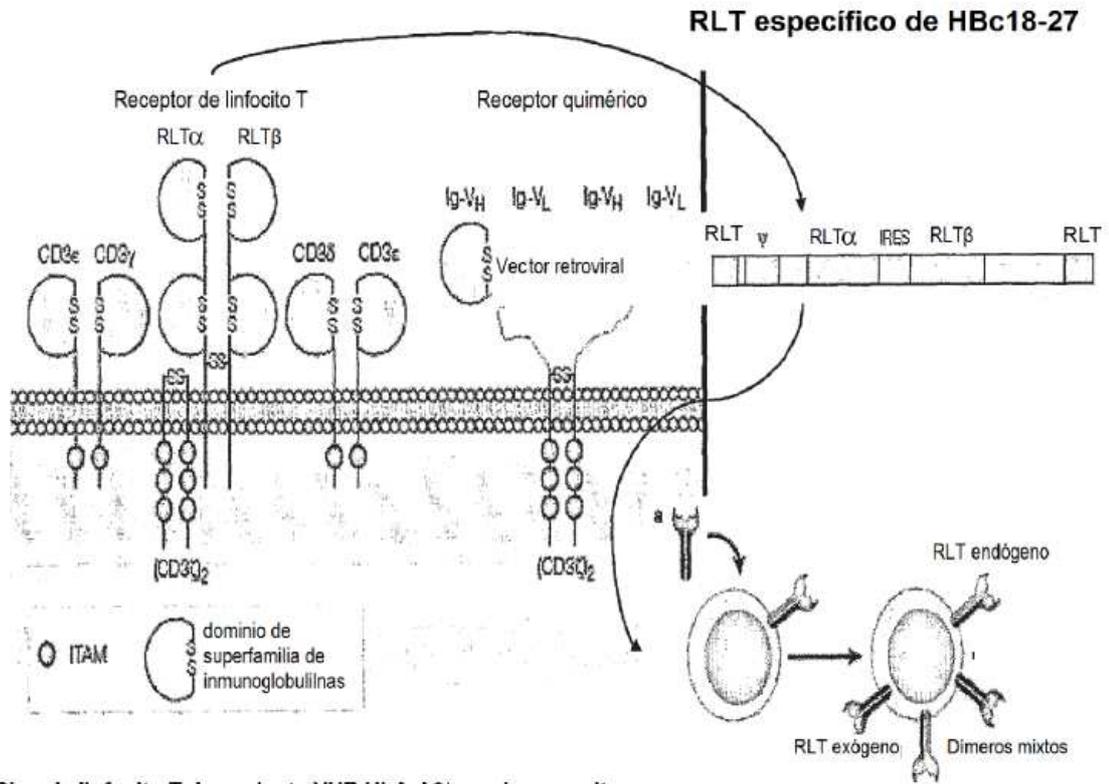
12. El polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el polipéptido es al menos un RLT soluble o un fragmento del mismo y está unido a al menos un fármaco antiviral, en donde dicho fragmento comprende un sitio activo que permite que el RLT reconozca el epítipo HBc18-27 y/o HBs370-79.

13. Un linfocito T aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 y/o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para su uso en el tratamiento de infección VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.

14. Un método *in vitro* para diagnosticar al menos a un sujeto que es capaz de resolver una infección por VHB o que padece o está en riesgo de padecer infecciones por VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB, comprendiendo dicho método:

- 35
- (a) proporcionar al menos una muestra de al menos un sujeto;
  - (b) detectar la presencia o la ausencia de al menos un polinucleótido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, y/o un homólogo de las mismas; y/o
  - 40 (c) detectar la presencia o la ausencia de al menos un polipéptido que comprende, que consiste sustancialmente o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55 y/o un homólogo de la misma;

45 en donde la presencia del polinucleótido y/o el polipéptido es indicativa de que el sujeto es capaz de resolver la infección por VHB y existe una correlación entre la ausencia del polinucleótido y/o polipéptido y la probabilidad de que el sujeto padezca o esté en riesgo de padecer una infección por VHB y/o carcinoma hepatocelular relacionado con VHB.



– Clon de linfocito T de paciente VHB HLA-A2<sup>+</sup> que ha resuelto

Schumacher y col., 2002, Nat Rev. Immunol, Vol 2:512

**Figura 1**

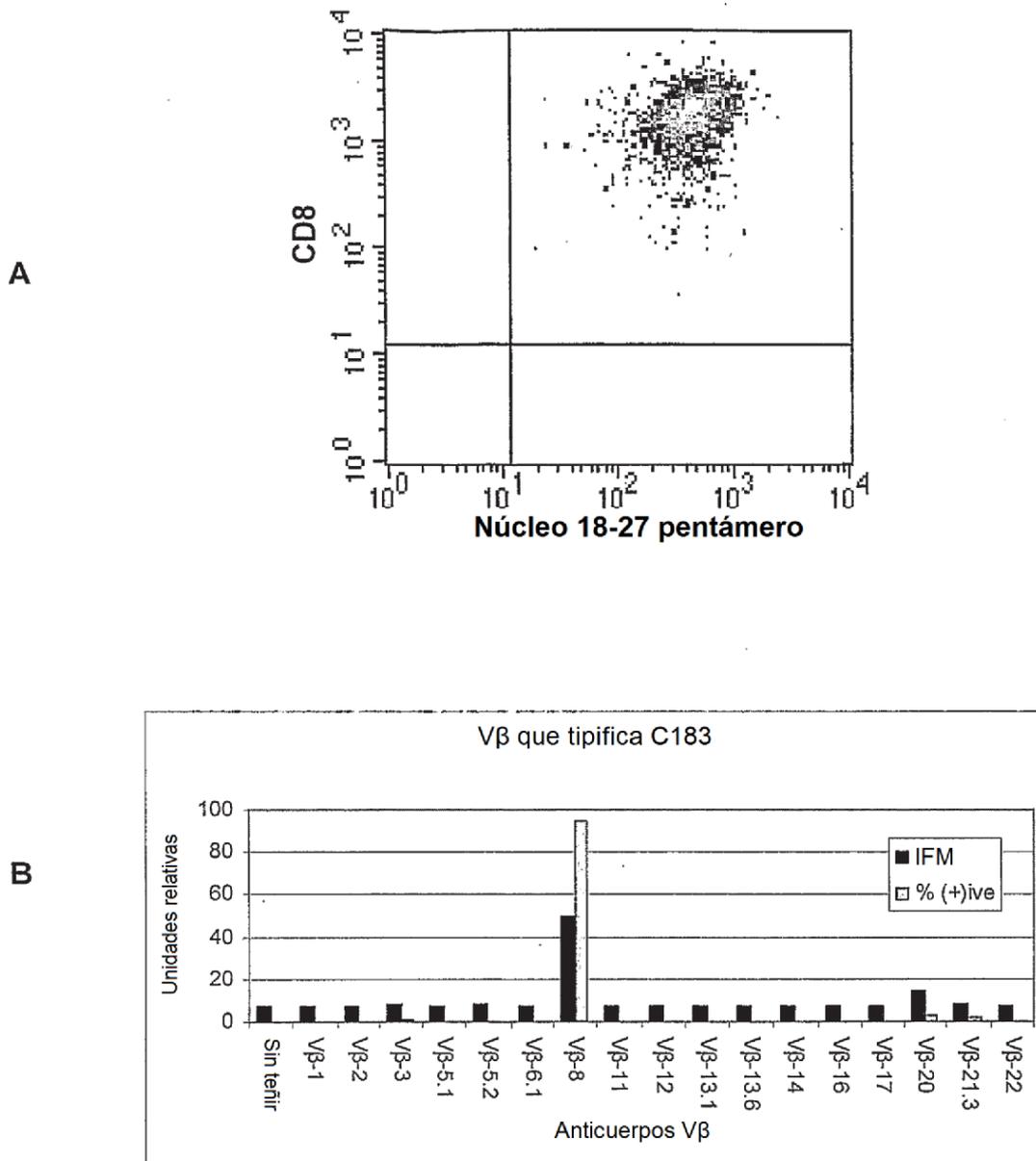


Figura 2

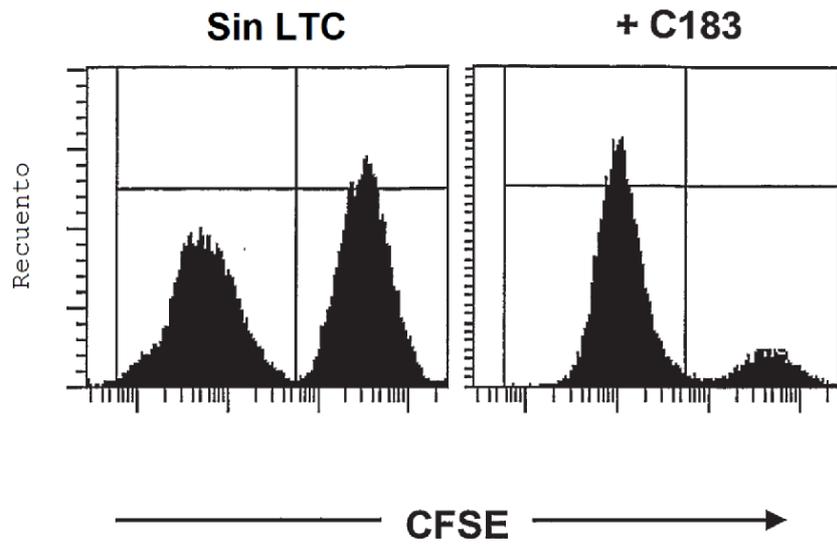


Figura 3

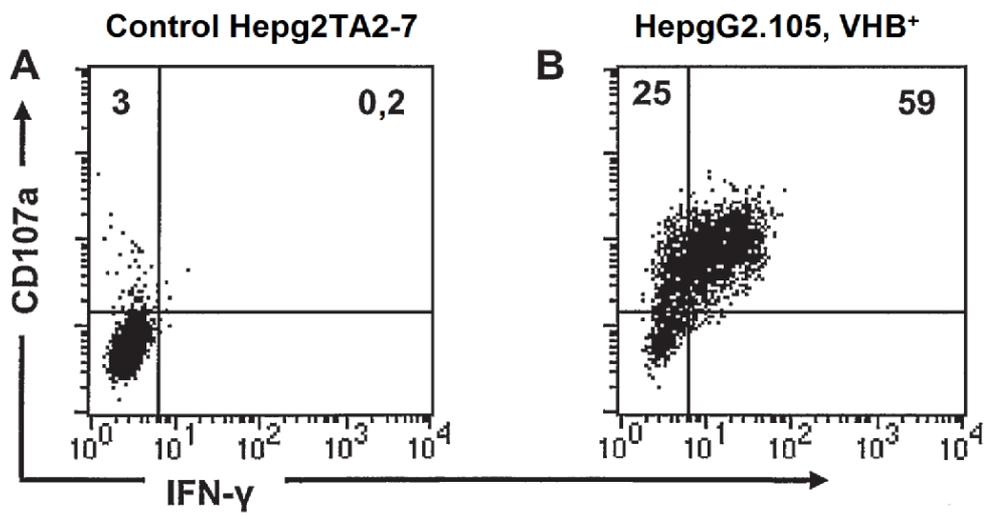


Figura 4

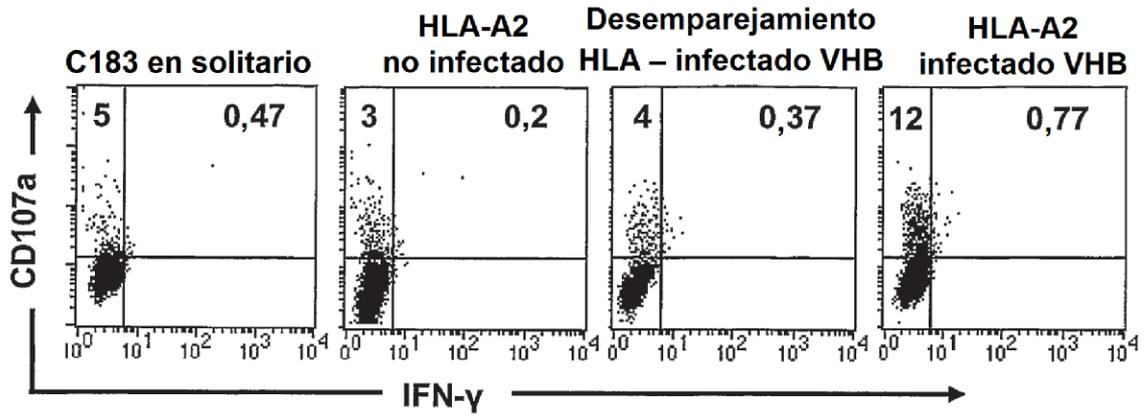


Figura 5

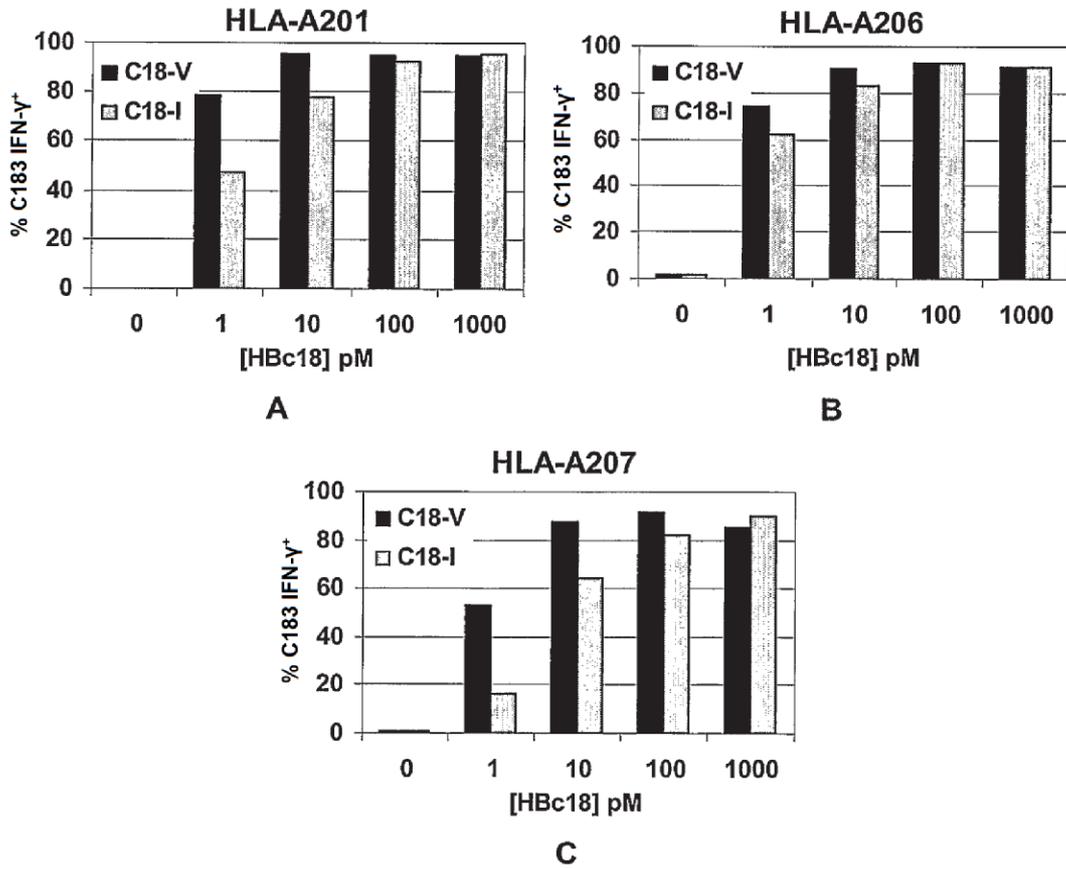
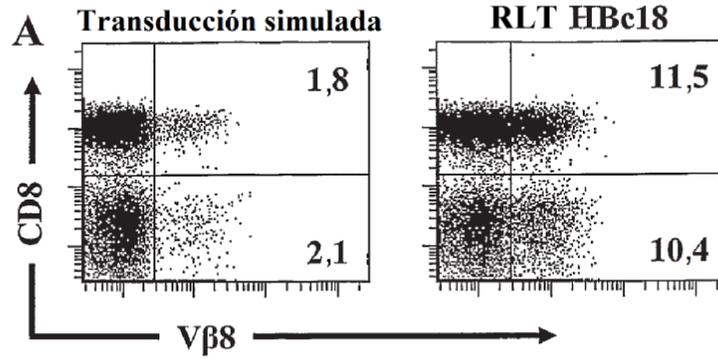


Figura 6

**Teñido de V $\beta$ 8**



**Teñido de pentámero**

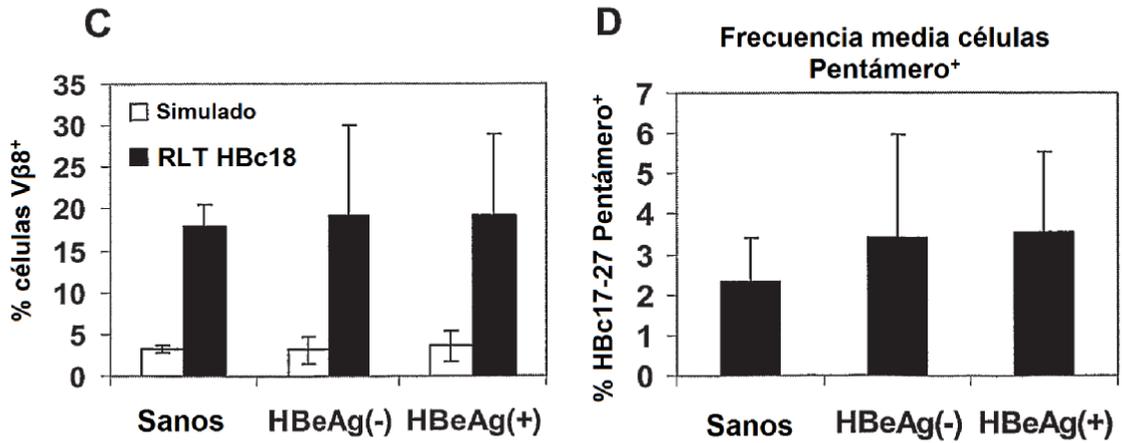
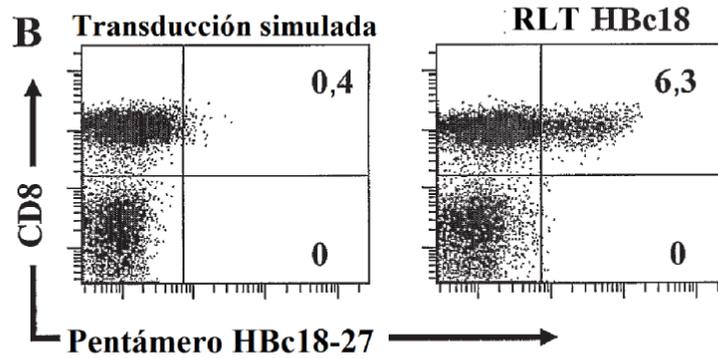


Figura 7

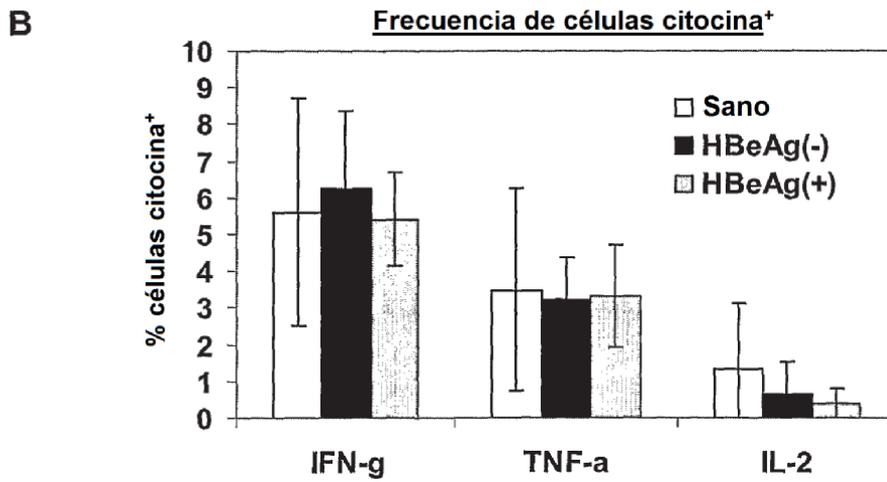
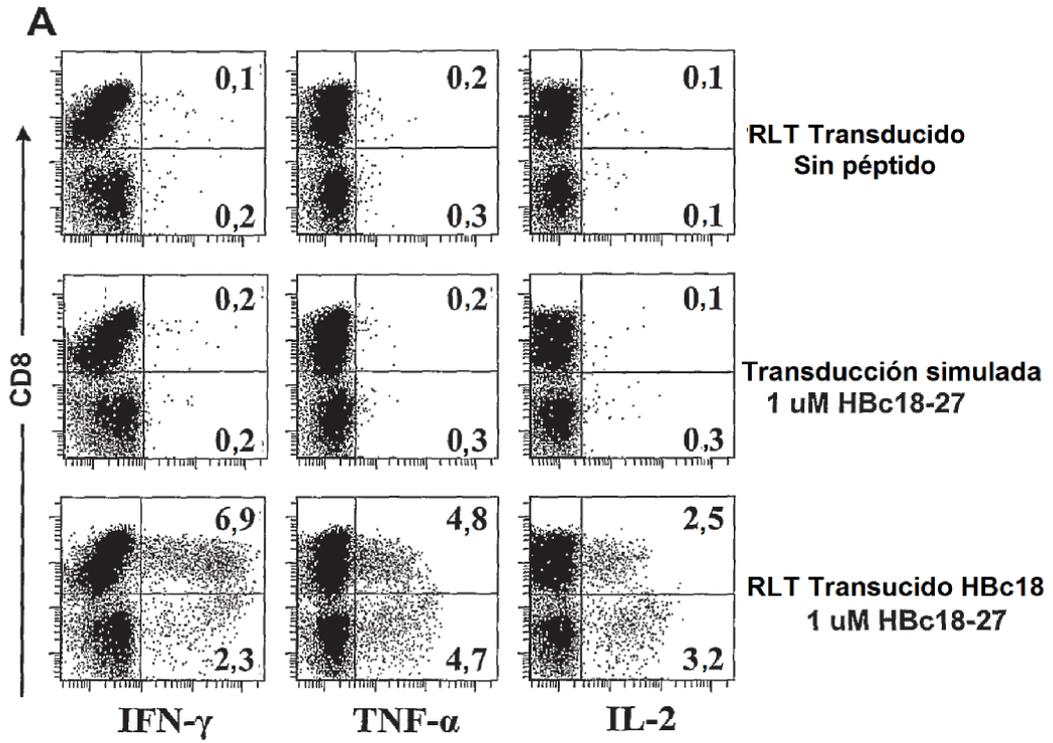
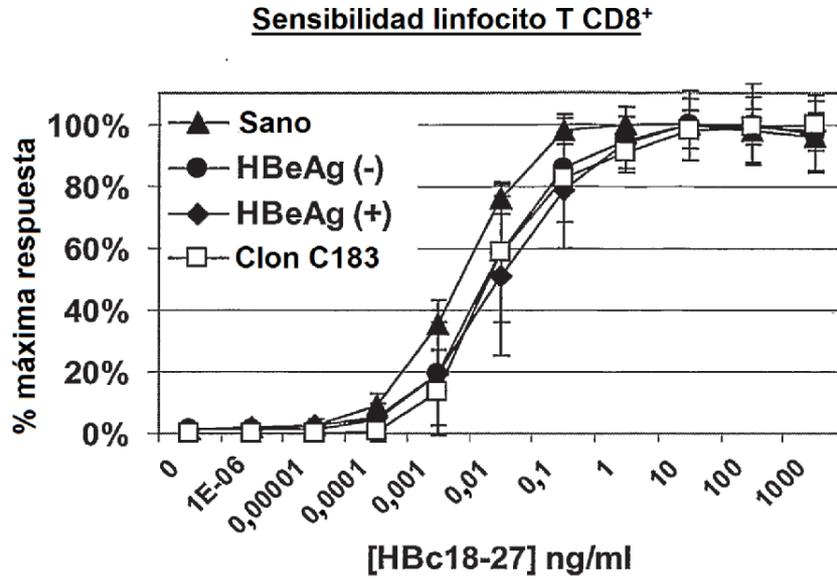


Figura 8

A



B

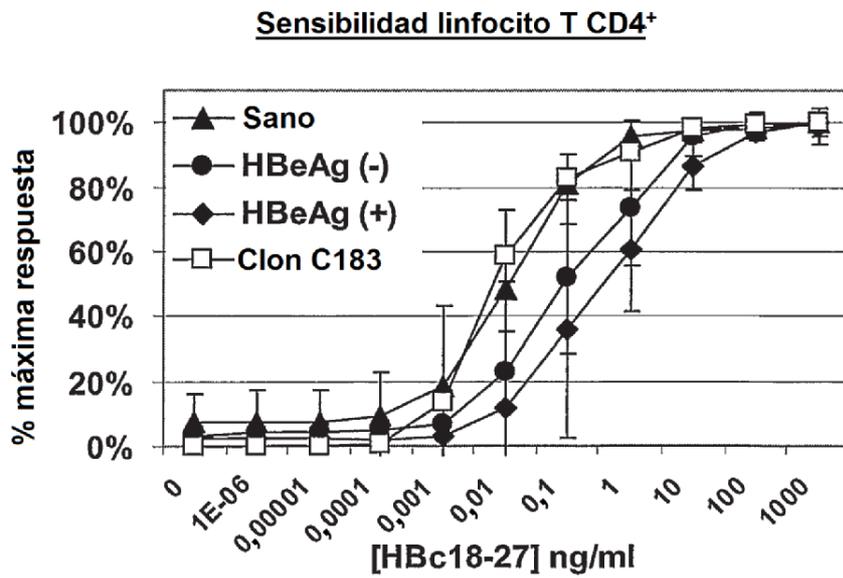


Figura 9

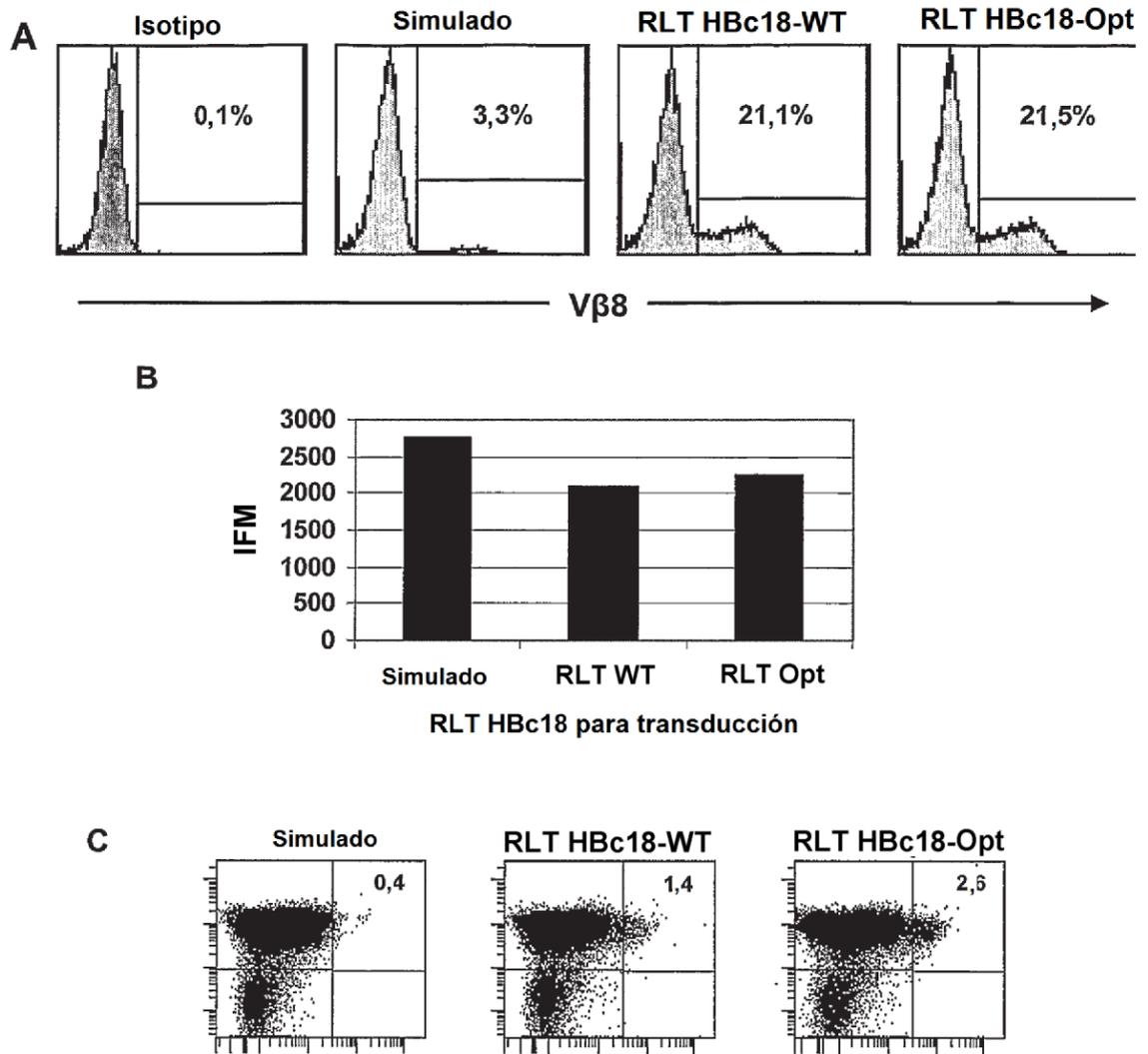


Figura 10

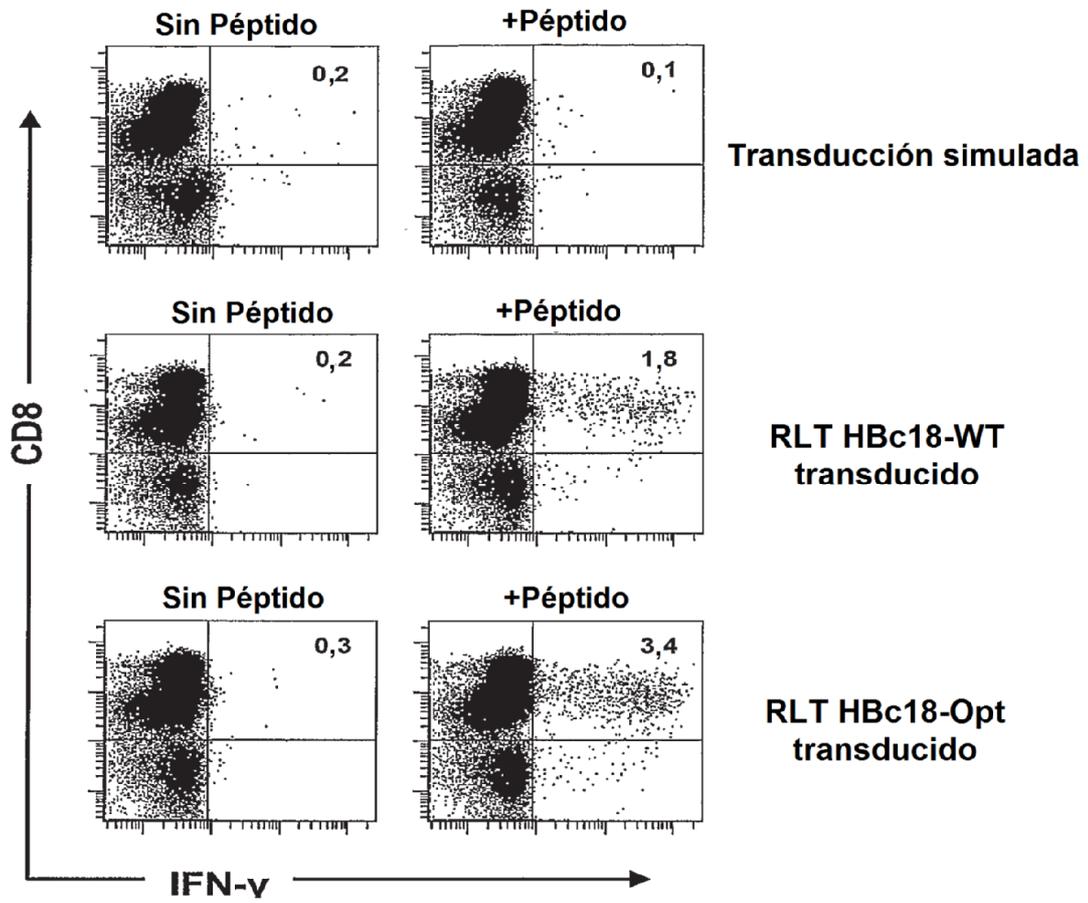


Figura 11

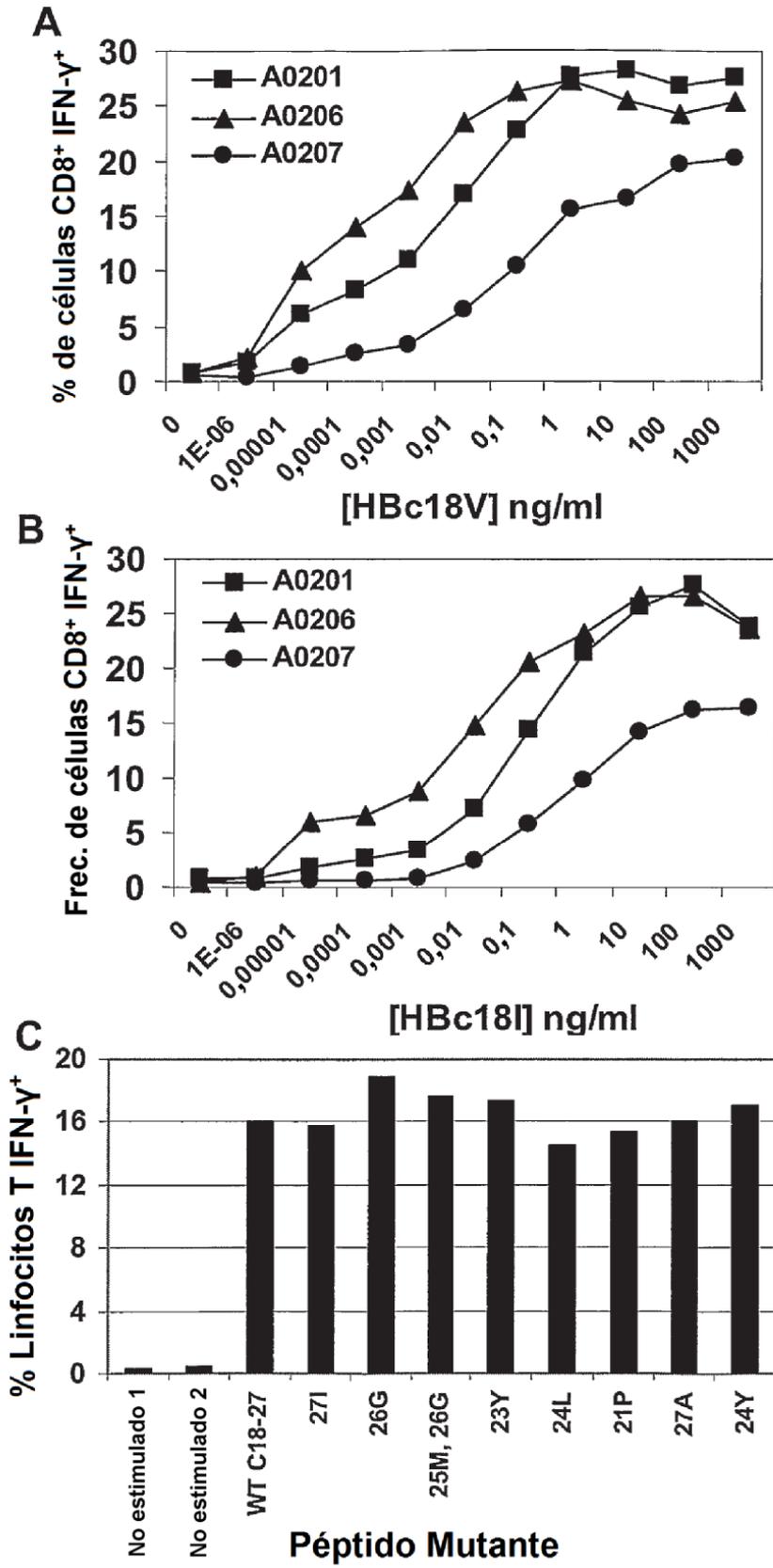


Figura 12

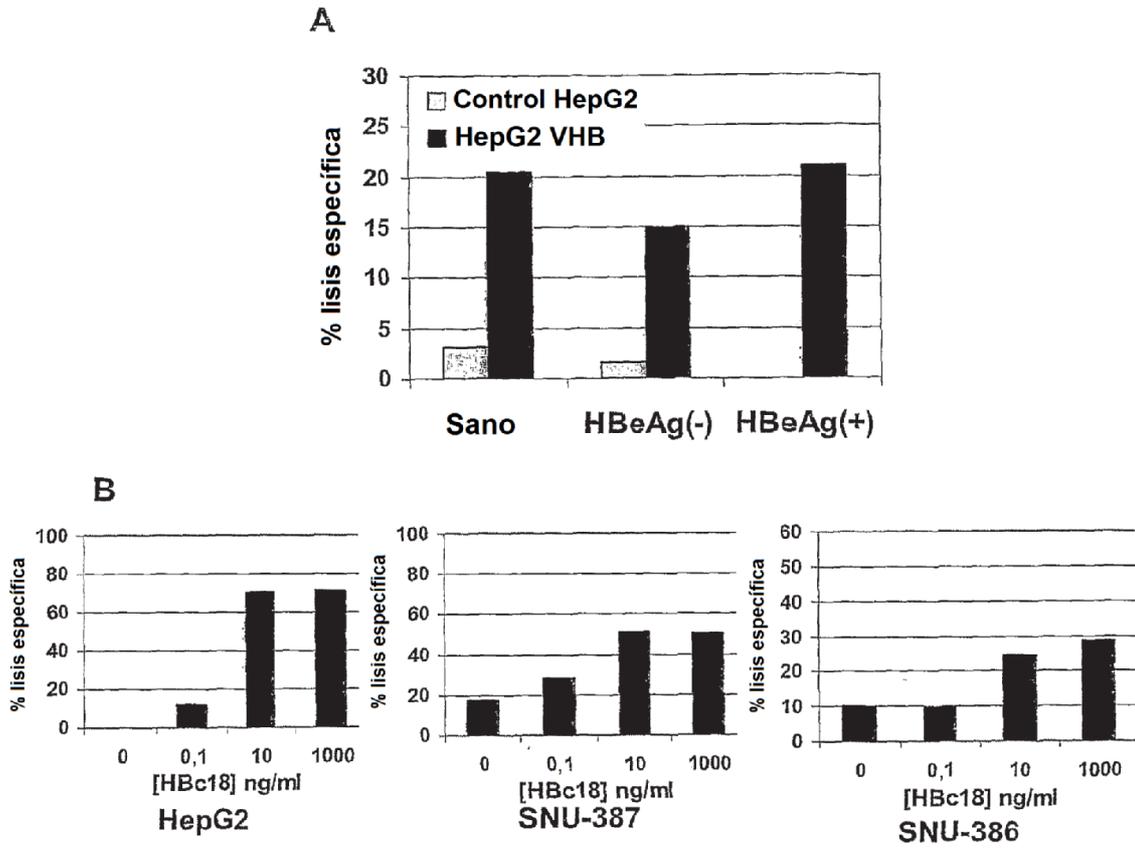
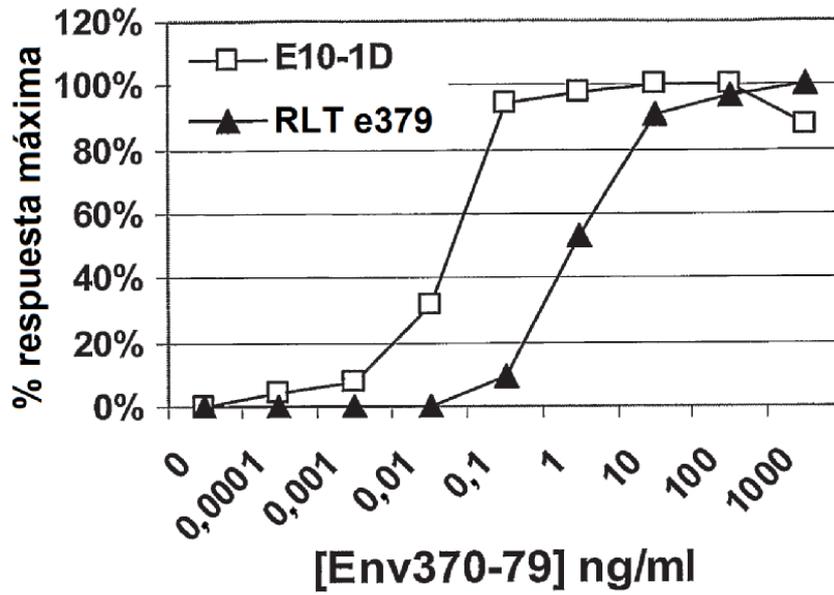


Figura 13

**A**



**B**

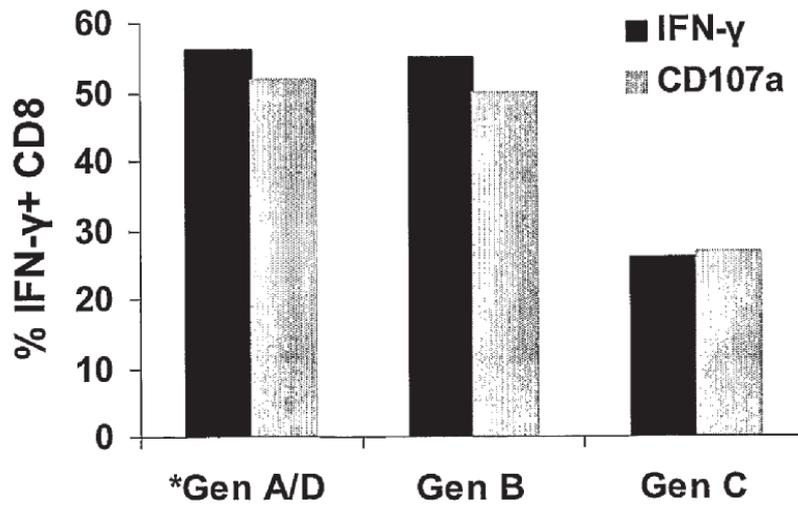


Figura 14