

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 472**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2014 PCT/US2014/046480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15009606**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2014 E 14748353 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3022223**

54 Título: **Receptores de células T anti-virus del papiloma humano 16 E6**

30 Prioridad:

15.07.2013 US 201361846167 P

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (OFFICE OF TECHNOLOGY
TRANSFER, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH)
(100.0%)
6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**HINRICHS, CHRISTIAN S. y
ROSENBERG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 745 472 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

Receptores de células T anti-virus del papiloma humano 16 E6

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de acuerdo con los números de proyecto ZIABC011477 y BC010984-5 por parte de los Institutos nacionales de salud, Instituto nacional del cáncer. El gobierno tiene ciertos derechos con respecto a la invención.

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

10 Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/846.167, presentada el 15 de julio de 2013.

Incorporación por referencia de material presentado por vía electrónica

15 En el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador presentada de manera simultánea con el presente documento e identificada de la siguiente manera: un archivo de 45.955 bytes de ASCII (texto) llamado "716827ST25.TXT", con fecha del 27 de mayo de 2014.

Antecedentes de la invención

20 La causa primaria de algunos tipos de cáncer tales como, por ejemplo, cáncer de cuello uterino, es la infección por virus del papiloma humano (VPH). A pesar de los avances en tratamientos tales como quimioterapia, el pronóstico para muchos cánceres, incluyendo cánceres asociados con VPH, puede ser malo. Por consiguiente, existe una necesidad no resuelta de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente cánceres asociados con VPH.

Breve resumen de la invención

30 Una realización de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica por virus del papiloma humano (VPH) 16 E6 y que comprende una región variable humana y una región constante murina, en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 3-8.

35 Otra realización de la invención proporciona un TCR aislado o purificado que tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6 y que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

40 La invención proporciona además polipéptidos y proteínas relacionados, así como ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinante, células huésped y poblaciones de células. La invención proporciona además anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los TCR de la invención.

45 La invención proporciona además métodos de detección de la presencia de un estado en un mamífero, en los que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH. El método de la invención de detección de la presencia de un estado en un mamífero comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende células del estado con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células huésped, anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas de la invención descritos en el presente documento, formando así un complejo, y (ii) detectar el complejo, en el que detección del complejo es indicativa de la presencia del estado en el mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

50 En otra realización de la invención, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células huésped, anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas de la invención descritos en el presente documento son para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado en un mamífero, en los que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

60 La figura 1 es un gráfico de barras que muestra la expresión de VPH 16 E6 (barras blancas), VPH 16 E7 (barras sombreadas sin rayas), VPH 18 E6 (barras no sombreadas con rayas) o VPH 18 E7 (barras sombreadas con rayas) con respecto a la expresión de gliceraldehído 3-fosato deshidrogenasa (GAPDH) por células CaSki, células HeLa, células 624 o células de tumor 3809.

65 Las figuras 2A y 2B son gráficos de barras que muestran interferón-gamma (IFN- γ) (pg/ml) secretado por

linfocitos de infiltración tumoral (TIL) a partir de fragmentos (F) 2-14 de tumor 3809 (A), fragmentos 15-24 (B) de tumor 3809, o TIL de melanoma tras el cultivo conjunto con células dendríticas autólogas (DC) que se habían pulsado con VPH 16 E6 solo (barras blancas), VPH 16 E6 en combinación con anticuerpo anti-clase I (barras sombreadas sin rayas), VPH 16 E7 solo (barras no sombreadas con rayas), VPH 16 E7 en combinación con anticuerpo anti-clase I (barras sombreadas con rayas), gp100 (barras negras) u OKT3 (barras con líneas horizontales).

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por números expandidos de TIL seleccionados mediante 4-1BB de 3809 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 (células HEK-293 con expresión estable de HLA-A2) transfectadas con proteína verde fluorescente (GFP), células 293-A2 transfectadas con VPH 16 E6, línea celular linfoblastoide (LCL) 3809 (células B que se han transformado usando virus de Epstein-Barr) cultivadas sin péptido, LCL 3809 cultivada conjuntamente con una combinación de péptidos de VPH 16 E6, u OKT3.

La figura 4A es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por linfocitos de sangre periférica (PBL) que no se transdujeron (sin transducir) (barras sin sombrear) o transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 (TCR de E6; barras sombreadas) tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con Péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH-18, células de control de melanoma, células de control de colangio, células 624 o células SiHa. La expresión de HLA-A2 y VPH-16 por cada célula diana se indica en la parte inferior de la figura 4A (“+” indica positivo para la expresión y “-” indica negativo para la expresión).

La figura 4B es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células SCC90, células CaSki, células 624, DMF/células 624 o células 4.7.20 pulsadas con péptidos de VPH 16 E7 sin anticuerpo (barras negras), con anticuerpo anti-MHC de clase I (barras grises), o anticuerpo anti-MHC de clase II (barras sin sombrear).

La figura 5 es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL positivos para CD8 sin transducir (barras sin sombrear sin rayas), PBL positivos para CD4 sin transducir (barras sin sombrear con rayas cruzadas) o PBL (positivos para CD8 (TCR de E6; barras sombreadas sin rayas) o positivos para CD4 (TCR de E6; barras sombreadas con rayas cruzadas)) que se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codificaba para SEQ ID NO: 17 y 18 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293-A2, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH, células de control de melanoma, células 624 o células SiHa.

La figura 6A es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL positivos para CD8 sin transducir (UT) (barras sin sombrear) o PBL positivos para CD8 transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 (barras sombreadas) tras el cultivo conjunto con células T2 diana pulsadas con concentraciones variables de péptido E6₂₉₋₃₈ (-log M).

La figura 6B es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL positivos para CD4 sin transducir (barras sin sombrear) o PBL positivos para CD4 transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 (TCR de E6; barras sombreadas) tras el cultivo conjunto con células T2 diana pulsadas con concentraciones variables de péptido E6₂₉₋₃₈ (-log M).

Descripción detallada de la invención

Una realización de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica por virus del papiloma humano (VPH) 16 E6 y que comprende una región variable humana y una región constante murina, en el que el TCR de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8. En una realización de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6₂₉₋₃₈.

El VPH 16 es el subtipo de VPH que está más habitualmente asociado con estados malignos. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que VPH 16 provoca cáncer al menos parcialmente mediante las acciones de la oncoproteína E6, que desregula el control del ciclo celular. VPH 16 E6 se expresa de manera constitutiva en células cancerosas y no se expresa por tejidos humanos normales sin infectar. VPH 16 E6 se expresa en una variedad de cánceres humanos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer del cuello uterino,

orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva y pene.

5 El TCR puede tener especificidad antigénica por cualquier proteína, polipéptido o péptido de VPH 16 E6. En una realización de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por una proteína de VPH 16 E6 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por un péptido de VPH 16 E6²⁹⁻³⁸ que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de TIHDIILECV (SEQ ID NO: 2).

10 En una realización de la invención, los TCR de la invención pueden reconocer VPH 16 E6 de una manera dependiente de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. "Manera dependiente de MHC de clase I", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR provoca una respuesta inmunitaria tras unirse a VPH 16 E6 dentro del contexto de una molécula de MHC de clase I. La molécula de MHC de clase I puede ser cualquier molécula de MHC de clase I conocida en la técnica, por ejemplo, moléculas de HLA-A. En una
15 realización preferida de la invención, la molécula de MHC de clase I es una molécula de HLA-A2.

Los TCR de la invención proporcionan muchas ventajas, incluyendo cuando se expresan por células usadas para transferencia de células adoptivas. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que dado que VPH 16 E6 se expresa por células infectadas por VPH 16 de múltiples tipos de cáncer, los TCR de la invención
20 proporcionan ventajosamente la capacidad de destruir células de múltiples tipos de cáncer asociado con VPH 16 y, por consiguiente, tratar o prevenir múltiples tipos de cáncer asociado con VPH 16. Adicionalmente, sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que dado que la proteína de VPH 16 E6 se expresa únicamente en células cancerosas, células infectadas por VPH 16 o células de estado premaligno positivo para VPH, los TCR de la invención seleccionan ventajosamente como diana la destrucción de células cancerosas,
25 células infectadas por VPH 16 o células de estado premaligno positivo para VPH, al tiempo que minimizan o eliminan la destrucción de células normales, no cancerosas, no infectadas por VPH y no premalignas positivas para VPH, reduciendo así, por ejemplo, minimizando o eliminando, la toxicidad. Además, los TCR de la invención pueden tratar o prevenir, ventajosamente, de manera satisfactoria, cánceres positivos para VPH que no responden a otros tipos de tratamiento tales como, por ejemplo, quimioterapia sola, cirugía o radiación.
30 Adicionalmente, los TCR de la invención proporcionan un reconocimiento altamente ávido de VPH 16 E6, lo que puede proporcionar, ventajosamente, la capacidad de reconocer células tumorales no manipuladas (por ejemplo, células tumorales que no se han tratado con interferón-gamma, transfectado con un vector que codifica para uno o ambos de VPH 16 E6 y HLA-A2, pulsado con el péptido E6²⁹⁻³⁸, o una combinación de los mismos).

35 La frase "especificidad antigénica", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR puede unirse específicamente a, y reconocer de manera inmunológica, VPH 16 E6 con alta avidéz. Por ejemplo, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por VPH 16 E6 si células T que expresan el TCR secretan al menos aproximadamente 200 pg/ml o más (por ejemplo, 200 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 5.000 pg/ml o más,
40 7.000 pg/ml o más, 10.000 pg/ml o más, o 20.000 pg/ml o más) de interferón gamma (IFN- γ) tras el cultivo conjunto con células diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con una baja concentración de péptido de VPH 16 E6 (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml o 5 ng/ml). Alternativa o adicionalmente, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por VPH 16 E6 si células T que expresan el TCR secretan al menos el doble de IFN- γ que el nivel de referencia de linfocitos de sangre periférica (PBL) sin transducir de IFN- γ tras el cultivo conjunto con células
45 diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con una baja concentración de péptido de VPH 16 E6. Las células que expresan los TCR de la invención también pueden secretar IFN- γ tras el cultivo conjunto con células diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con concentraciones superiores de péptido de VPH 16 E6.

50 La divulgación proporciona un TCR que comprende dos polipéptidos (es decir, cadenas de polipéptido), tales como una cadena alfa (α) de un TCR, una cadena beta (β) de un TCR, una cadena gamma (γ) de un TCR, una cadena delta (δ) de un TCR, o una combinación de las mismas. Los polipéptidos del TCR pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que el TCR tenga especificidad antigénica por VPH 16 E6.

55 El TCR comprende dos cadenas de polipéptido, cada una de las cuales comprende una región variable humana que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR)1, una CDR2 y una CDR3 de un TCR. El TCR comprende una primera cadena de polipéptido que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena α), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
60 NO: 5 (CDR3 de cadena α), y una segunda cadena de polipéptido que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena β), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena β), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β).

65 En una realización de la invención, el TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. El TCR puede comprender la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α), SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β), o ambas de SEQ ID NO: 9 y 10. Preferiblemente, el TCR de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 10.

- 5 Los TCR pueden comprender además una región constante derivada a partir de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón. Con respecto a esto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina), o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16.
- 10 El TCR quimérico puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el TCR puede comprender una cadena alfa que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α humana) y SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), una cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina),
- 15 o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-10 y 15-16.

Tal como se usa en el presente documento, el término "murino" o "humano", cuando se refieren a un TCR o a cualquier componente de un TCR descrito en el presente documento (por ejemplo, región determinante de la complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena alfa y/o cadena beta), significan un TCR (o componente del mismo) que se deriva de un ratón o un ser humano, respectivamente, es decir, un TCR (o componente del mismo) que se originó a partir de o se expresó, en un momento, por una célula T de ratón o una célula T humana, respectivamente.

20

El TCR quimérico puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. Cada una de la cadena α y la cadena β del TCR quimérico pueden comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena α comprende la región variable humana de una cadena α y la región constante murina de una cadena α tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Una cadena α de este tipo puede aparearse con cualquier cadena β de un TCR. Preferiblemente, la cadena β del TCR quimérico comprende la región variable humana de una cadena β y la región constante murina de una cadena β tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. El TCR quimérico puede comprender, por tanto, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, o ambas de SEQ ID NO: 17 y 18. Preferiblemente, el TCR quimérico de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 17 y 18.

25

30

35

En una realización de la invención, el TCR es un TCR humano. El TCR humano comprende cualquiera de las regiones CDR tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Con respecto a esto, una realización de la invención proporciona un TCR aislado o purificado que tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6 y que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8. El TCR humano puede comprender cualquiera de las regiones variables descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención.

40

Los TCR humanos de la invención comprenden además una región constante humana. Con respecto a esto, el TCR humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena α humana), SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena β humana), o ambas de SEQ ID NO: 13 y 14.

45

El TCR humano puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el TCR puede comprender una cadena alfa que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α humana) y SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena α humana), una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena β humana), o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-10 y 13-14.

50

El TCR humano puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. Cada una de la cadena α y la cadena β del TCR humano puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena α comprende la región variable humana de una cadena α y la región constante humana de una cadena α tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Una cadena α de este tipo puede aparearse con cualquier cadena β de un TCR. Preferiblemente, la cadena β del TCR humano comprende la región variable humana de una cadena β y la región constante humana de una cadena β tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. El TCR humano puede comprender, por tanto, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o ambas de SEQ ID NO: 11 y 12. Preferiblemente, el TCR humano de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 y 12.

55

60

65

La invención también proporciona un polipéptido que comprende una parte funcional del TCR de la invención, en el que la parte funcional se une específicamente a VPH 16 E6 y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8, SEQ ID NO: 9 y 10, o SEQ ID NO: 11 y 12. El término "polipéptido" tal como se usa en el presente documento incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena individual de aminoácidos conectados mediante uno o más enlaces peptídicos.

Una parte funcional puede ser cualquier parte que comprende aminoácidos contiguos del TCR (o variante funcional del mismo) del que forma parte, siempre que la parte funcional se una específicamente a VPH 16 E6. El término "parte funcional" cuando se usa en referencia a un TCR (o variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR (o variante funcional del mismo), parte o fragmento que conserva la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo) del que forma parte (el TCR original o variante funcional original del mismo). Las partes funcionales abarcan, por ejemplo, las partes de un TCR (o variante funcional del mismo) que conservan la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6 (por ejemplo, de una manera dependiente de HLA-A2), o detectar, tratar o prevenir cáncer, hasta un grado similar, el mismo grado o hasta un grado superior, al TCR original (o variante funcional del mismo). En referencia al TCR original (o variante funcional del mismo), la parte funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10%, el 25%, el 30%, el 50%, el 68%, el 80%, el 90%, el 95%, o más, del TCR original (o variante funcional del mismo).

La parte funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo-terminal de la parte, o en ambos extremos terminales, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR original o variante funcional del mismo. De manera deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la parte funcional, por ejemplo, unirse específicamente a VPH 16 E6; y/o tener la capacidad de detectar cáncer, tratar o prevenir cáncer, etc. De manera más deseable, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR original o variante funcional del mismo.

El polipéptido puede comprender una parte funcional de cualquiera o ambas de las cadenas α y β de los TCR o variante funcional de los mismos, tal como una parte funcional que comprende una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de la(s) región/regiones variable(s) de la cadena α y/o la cadena β de un TCR o variante funcional del mismo. En una realización de la invención, el polipéptido comprende una parte funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), y 8 (CDR3 de cadena β).

El polipéptido puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR o variante funcional del mismo que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. Con respecto a esto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α), y SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β).

El polipéptido puede comprender además una región constante derivada a partir de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón. Con respecto a esto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena α humana), SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena β humana), SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina), ambas de SEQ ID NO: 13 y 14, o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 13 y 14 o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16.

El polipéptido puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el polipéptido puede comprender las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 15, ambas de SEQ ID NO: 9 y 13, ambas de SEQ ID NO: 10 y 16, ambas de SEQ ID NO: 10 y 14, la totalidad de SEQ ID NO: 9-10 y 15-16, o la totalidad de SEQ ID NO: 9-10 y 13-14.

El polipéptido puede comprender la longitud completa de una cadena α o β de uno de los TCR o variante funcional de los mismos descritos en el presente documento. Alternativamente, el polipéptido puede comprender las cadenas α y β de los TCR de la invención o variantes funcionales de los mismos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede comprender las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 y 12 o ambas de SEQ ID NO: 17 y 18. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 y 12 o ambas de SEQ ID NO: 17 y 18.

La divulgación proporciona además una proteína que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por "proteína" quiere decirse una molécula que comprende una o más cadenas de polipéptido.

En una realización, la proteína de la invención comprende una primera cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8. Alternativa o adicionalmente, la proteína de la invención comprende una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y

una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. La proteína puede comprender, por ejemplo, una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 13 o ambas de SEQ ID NO: 9 y 15, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 y 14 o ambas de SEQ ID NO: 10 y 16. La proteína puede comprender, por ejemplo, una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 ó 17, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ó 18. En este caso, la proteína puede ser un TCR. Alternativamente, si, por ejemplo, la proteína comprende una única cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12 o SEQ ID NO: 17 y 18, o si las cadenas de polipéptido primera y/o segunda de la proteína comprenden además otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifica para una inmunoglobulina o una parte de la misma, entonces la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. Con respecto a esto, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento junto con al menos otro polipéptido. El otro polipéptido puede existir como polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como polipéptido que se expresa en marco (en tándem) con uno de los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento. El otro polipéptido puede codificar para cualquier molécula peptídica o proteica, o una parte de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula de MHC, una molécula de CD1, por ejemplo, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. En la técnica se conocen métodos adecuados de preparación de proteínas de fusión, e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes. Véase, por ejemplo, Choi *et al.*, Mol. Biotechnol. 31: 193-202 (2005).

En algunas realizaciones de la invención, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden expresarse como una única proteína que comprende un péptido ligador que une la cadena α y la cadena β . Con respecto a esto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12 o SEQ ID NO: 17 y 18 pueden comprender además un péptido ligador. El péptido ligador puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR recombinante (incluyendo partes funcionales y variantes funcionales del mismo), polipéptido y/o proteína en una célula huésped. El péptido ligador puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Por ejemplo, el péptido ligador puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. Tras la expresión del constructo que incluye el péptido ligador por una célula huésped, el péptido ligador puede escindirse, dando como resultado cadenas α y β separadas.

La proteína de la invención puede ser un anticuerpo recombinante que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo recombinante" se refiere a una proteína recombinante (por ejemplo, modificada por ingeniería genética) que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una cadena de polipéptido de un anticuerpo, o una parte del mismo. El polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede ser una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un fragmento Fc, Fab o F(ab)₂' de un anticuerpo, etc. La cadena de polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede existir como polipéptido separado del anticuerpo recombinante. Alternativamente, la cadena de polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede existir como polipéptido que se expresa en marco (en tándem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede ser un polipéptido de cualquier anticuerpo o cualquier fragmento de anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento.

Se incluyen variantes funcionales de los TCR de la invención descritos en el presente documento. El término "variante funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a un TCR, polipéptido o proteína que tiene identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con respecto a un TCR, polipéptido o proteína original, variante funcional que conserva la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína del que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, las variantes del TCR, polipéptido o proteína descrito en el presente documento (el TCR, polipéptido o proteína original) que conservan la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6 por el que el TCR original tiene especificidad antigénica o al que se une específicamente el polipéptido o proteína original, hasta un grado similar, el mismo grado o hasta un grado superior, al TCR, polipéptido o proteína original. Haciendo referencia al TCR, polipéptido o proteína original, la variante funcional puede ser idéntica, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 30%, el 50%, el 75%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, al TCR, polipéptido o proteína original.

La variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución de aminoácido conservativa. En la técnica se conocen sustituciones de aminoácido conservativas, e incluyen sustituciones de aminoácido en las que se intercambia un

aminoácido que tiene determinadas propiedades físicas y/o químicas por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácido conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido por otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución de aminoácido no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácido no conservativa no interfiera con, o inhiba, la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución de aminoácido no conservativa potencia la actividad biológica de la variante funcional, de tal manera que se aumenta la actividad biológica de la variante funcional en comparación con el TCR, polipéptido o proteína original.

El TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de tal manera que otros componentes del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian sustancialmente la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína. Con respecto a esto, el TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir, por ejemplo, esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, 17 ó 18, ambas de SEQ ID NO: 11 y 12, ambas de SEQ ID NO: 17 y 18, ambas de SEQ ID NO: 11 y 18, o ambas de SEQ ID NO: 17 y 12. Además, por ejemplo, los TCR (incluyendo variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas pueden consistir esencialmente en la(s) secuencia(s) de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, o ambas de SEQ ID NO: 9 y 10. Además, los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena α), SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena α), SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena β), SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena β), y SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β).

Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los TCR, polipéptidos o proteínas conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6; detectar cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH en un mamífero; o tratar o prevenir cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una longitud en el intervalo de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como una longitud de 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos. Con respecto a esto, los polipéptidos de la invención también incluyen oligopéptidos.

Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se producen de manera natural. Tales aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano-carboxílico, norleucina, ácido α -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina, β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano-carboxílico, ácido α -aminociclohexano-carboxílico, ácido α -aminocicloheptano-carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse, por ejemplo, mediante un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

El TCR, polipéptido y/o proteína de la invención puede obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Se describen métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas en referencias, tales como Chan *et al.*, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood *et al.*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; y patente estadounidense n.º 5.449.752. Además, pueden producirse polipéptidos y proteínas de manera recombinante usando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento usando métodos recombinantes convencionales. Véanse, por ejemplo, Green y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden aislarse y/o purificarse a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. En la técnica se conocen bien métodos de aislamiento y purificación. Alternativamente, los TCR, polipéptidos y/o proteínas descritos en el presente documento (incluyendo variantes funcionales de los mismos)

pueden sintetizarse de manera comercial por empresas, tales como Synpep (Dublín, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Con respecto a esto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

5 Se incluyen conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células huésped o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención. En la técnica se conocen conjugados, así como métodos de síntesis de conjugados en general (véanse, por ejemplo, Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) y Kirin *et al.*, *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005)).

10

Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención. Por "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento se incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y significa de manera general un polímero de ADN o ARN, que puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, sintetizarse u obtenerse (por ejemplo, aislarse y/o purificarse) a partir de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace entre nucleótidos natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosfoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido sin modificar. En una realización, el ácido nucleico comprende ADN complementario (ADNc). Generalmente se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, en algunos casos puede ser adecuado, tal como se comenta en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

15

20

25

Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas uniendo segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en el punto (i) anterior. Para los fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

30

35

40

45

Los ácidos nucleicos pueden construirse basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Green y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de diversas maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N⁶, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, pueden adquirirse uno o más de los ácidos nucleicos de la invención a partir de empresas, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

50

55

60

65

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas o variantes funcionales de los mismos descritos en el presente documento. La secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la totalidad de SEQ ID NO: 31-36 (que codifican para CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β , CDR3 β , respectivamente); la totalidad de SEQ ID NO: 31-33; la totalidad de SEQ ID NO: 34-36; ambas de SEQ ID NO: 19-20 (que codifican para regiones variables de cadenas α y β , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 23-24 (que codifican para región constante humana de cadenas α y β , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 25-26 (que codifican para región constante murina de cadenas α y β , respectivamente), la totalidad de SEQ ID NO: 19-20 y 23-24, la totalidad de SEQ ID NO: 19-20 y 25-26, ambas de SEQ ID NO: 21-22 (que codifican para cadenas α y β humanas, respectivamente), o ambas de SEQ ID NO: 27-28 (que codifican para cadenas α y β quiméricas, respectivamente). La secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, una cualquiera de SEQ ID NO: 19-28 y 31-36.

En una realización de la invención, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos no natural. Puede considerarse que una secuencia de nucleótidos es "no natural" si la secuencia de nucleótidos no se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede estar optimizada en cuanto a codones. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización en cuanto a codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización en cuanto a codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar sustituir un codón nativo por otro codón que

codifica para el mismo aminoácido, pero puede traducirse por ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando por tanto la eficiencia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras de ARNm secundarias que interferirán con la traducción, aumentando por tanto la eficiencia de traducción. La secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, SEQ ID NO: 38 (región variable de cadena α), SEQ ID NO: 39 (región variable de cadena β), o SEQ ID NO: 38 y 39.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas se hibrida preferiblemente en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" quiere decirse que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es más fuerte de manera detectable que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirán un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que sólo contiene unos pocos apareamientos erróneos dispersados, de una secuencia aleatoria que resultó tener unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, de 3-10 bases) que se apareaban con la secuencia de nucleótidos. Tales regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad hace que puedan distinguirse fácilmente. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirán, por ejemplo, condiciones de bajo contenido en sal y/o alta temperatura, tal como se proporciona mediante NaCl a aproximadamente 0,02-0,1 M o equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si es que toleran algo, de apareamiento erróneo entre la secuencia de nucleótidos y la cadena diana o molde, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. Generalmente se aprecia que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 70% o más, por ejemplo, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, o aproximadamente el 99%, a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. Con respecto a esto, la invención proporciona vectores de expresión recombinante que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. En una realización de la invención, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena α , la cadena β y péptido ligador. Por ejemplo, en una realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones que comprende SEQ ID NO: 29 (que codifica para cadenas α y β químicas de SEQ ID NO: 17 y 18 con un ligador posicionado entre las mismas).

Para los fines en el presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido genéticamente modificado que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido mediante una célula huésped, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para hacer que se exprese el ARNm, proteína, polipéptido o péptido dentro de la célula. En su conjunto, los vectores de la invención no se producen de manera natural. Sin embargo, partes de los vectores pueden producirse de manera natural. Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN y ARN, que pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, sintetizarse u obtenerse en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinante pueden comprender enlaces entre nucleótidos que se producen de manera natural, que no se producen de manera natural o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces entre nucleótidos que no se producen de manera natural o alterados no dificultan la transcripción o replicación del vector.

El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula huésped adecuada. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie de pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También pueden usarse vectores de bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101,2, pBI101,3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). Preferiblemente, el vector

de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. En una realización especialmente preferida, el vector de expresión recombinante es un vector de MSGV1. En una realización, un vector de MSGV1 que comprende una secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones que codifica para un TCR quimérico que comprende SEQ ID NO: 17 y 18 de la invención comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30.

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas, por ejemplo, en Green y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Pueden prepararse constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Pueden derivarse sistemas de replicación, por ejemplo, a partir de ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

De manera deseable, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas para el tipo de célula huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en la que va a introducirse el vector, según sea apropiado y teniendo en consideración si el vector está basado en ADN o ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células huésped transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocida, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en una célula huésped auxotrófica para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo variantes funcionales de los mismos), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a, o que se hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo variantes funcionales de los mismos). La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo, se encuentra dentro de las habilidades habituales del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de las habilidades del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de VSR, y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murino.

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse para expresión transitoria, para expresión estable, o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinante pueden realizarse para expresión constitutiva o para expresión inducible. Además, los vectores de expresión recombinante pueden realizarse para incluir un gene suicida.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gene suicida" se refiere a un gen que hace que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad frente a un agente, por ejemplo, un fármaco, en la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando se pone la célula en contacto con el, o se expone al, agente. En la técnica se conocen genes suicida (véase, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, R.U.), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina daminasa, purina nucleósido fosforilasa, y nitrorreductasa.

Otra realización de la invención proporciona además una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante de la invención descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de planta, animal, hongo o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente a partir de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. En la técnica se conocen células huésped adecuadas e incluyen, por ejemplo, células *E. coli* DH5 α , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 α . Para los fines de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula de mamífero. Lo más preferiblemente, la célula huésped es una célula humana. La célula huésped es preferiblemente un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Más preferiblemente, la célula huésped es una célula T.

Para los fines en el presente documento, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T a partir de una línea de células T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida a partir de un mamífero. Si se obtiene a partir de un mamífero, la célula T puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o líquidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. Preferiblemente, la célula T es una célula T humana. Más preferiblemente, la célula T es una célula T aislada a partir de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier fase de desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, células T doble positivas CD4⁺/CD8⁺, células T cooperadoras CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, células T CD4⁺, células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos de infiltración tumoral (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria centrales y células T de memoria efectoras), células T vírgenes, y similares.

La invención también proporciona una población de células que comprende al menos una célula huésped de la invención descrita en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinante, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consiste esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonal, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de tal manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento.

En una realización de la invención, los números de células en la población pueden expandirse rápidamente. La expansión de los números de células T puede lograrse mediante cualquiera de varios métodos tal como se conoce en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 8.034.334; patente estadounidense 8.383.099; publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133; Dudley *et al.*, *J. Immunother.*, 26:332-42 (2003); y Riddell *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 128:189-201 (1990).

La invención proporciona además un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una parte funcional de cualquiera de los TCR de la invención descritos en el presente documento. La parte funcional se une específicamente al antígeno de cáncer, comprendiendo la parte funcional la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), y 8 (CDR3 de cadena β). En una realización preferida, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epitopo que está formado por las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena alfa y CDR1-3 de la cadena beta). El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que se conoce en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que se produce de manera natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado a partir de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado por ingeniería genética, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidéz por la parte funcional del TCR de la invención. De manera deseable, el anticuerpo es específico para la parte funcional del TCR de la invención, de tal manera que hay reacción cruzada mínima con otros péptidos o proteínas.

En la técnica se conocen métodos de someter a prueba anticuerpos para detectar la capacidad de unirse a cualquier parte funcional o variante funcional del TCR de la invención e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición de competencia (véanse, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado a continuación, y publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1).

En la técnica se conocen métodos adecuados de producir anticuerpos. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma convencionales, por ejemplo, en Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway *et al.* (eds.), *Immunobiology*, 8ª ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2011)). Alternativamente, en la técnica se conocen otros métodos, tales como métodos de hibridoma de VEB (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder *et al.*, *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión en vector de bacteriófago (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, se describen métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1.

Además puede usarse presentación en fago para generar el anticuerpo de la invención. Con respecto a esto, pueden generarse bibliotecas de fagos que codifican para dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos usando técnicas convencionales de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Green and Sambrook *et al.* (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2012)). Se seleccionan fagos que codifican para una región variable con la especificidad deseada para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo reconstituido en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridoma, de tal manera que la célula secreta anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente, Huse *et al.*, citado anteriormente, y patente estadounidense 6.265.150).

Pueden producirse anticuerpos mediante ratones transgénicos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera específicos. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway *et al.*, citado anteriormente.

En la técnica se conocen bien métodos para generar anticuerpos humanizados y se describen en detalle, por ejemplo, en Janeway *et al.*, citado anteriormente, patentes estadounidenses 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, patente europea n.º 0239400 B1, y patente del Reino Unido n.º 2188638. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando la tecnología de renovación de anticuerpos descrita, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.639.641 y Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994).

La divulgación también proporciona partes de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. La parte de unión a antígeno puede ser cualquier parte que tiene al menos un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

Un fragmento de anticuerpo de fragmento de región variable de cadena sencilla (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unido a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo a través de un péptido sintético, puede generarse usando técnicas de tecnología de ADN recombinante de rutina (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente). De manera similar, pueden prepararse fragmentos de región variable estabilizados por disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter *et al.*, *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo no se limitan a estos tipos de fragmentos de anticuerpo a modo de ejemplo.

Además, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, puede modificarse para comprender una etiqueta detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano), y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

Los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo partes de unión a antígeno de los mismos) de la invención, pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislado" tal como se usa en el presente documento significa que se ha retirado de su entorno natural. El término "purificado" tal como se usa en el presente documento significa que se ha aumentado su pureza, en el que "pureza" es un término relativo, y que no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50%, puede ser de más del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, o puede ser del 100%.

Los TCR, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo partes de unión a antígeno de los mismos), polipéptidos de la invención, todos los cuales se denominan de manera colectiva "materiales de TCR de la invención" a continuación en el presente documento, pueden formularse para dar una composición, tal como una composición farmacéutica. Con respecto a esto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, partes funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo partes de unión a antígeno de los mismos) descritos en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen cualquiera de los materiales de TCR de la invención pueden comprender más de un material de TCR de la invención, por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR diferentes. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otro(s) fármaco(s) o agente(s) farmacéuticamente activo(s), tal como un agente quimioterápico, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente para el material de TCR de la

invención particular en consideración. Tales portadores farmacéuticamente aceptables los conocen bien los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

5

La elección del portador estará determinada en parte por el material de TCR de la invención particular, así como por el método particular usado para administrar el material de TCR de la invención. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las formulaciones adecuadas pueden incluir cualquiera de aquellas para administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal o interperitoneal. Puede usarse más de una vía para administrar los materiales de TCR de la invención, y en determinados casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

10

Preferiblemente, el material de TCR de la invención se administra mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa. Cuando el material de TCR de la invención es una célula huésped que expresa el TCR de la invención, el portador farmacéuticamente aceptable para las células para inyección puede incluir cualquier portador isotónico tal como, por ejemplo, solución salina normal (aproximadamente el 0,90% p/v de NaCl en agua, aproximadamente 300 mOsm/l de NaCl en agua, o aproximadamente 9,0 g de NaCl por litro de agua), disolución de electrolito NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), dextrosa a aproximadamente el 5% en agua, o lactato de Ringer. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable está complementado con albúmina de suero humana.

15

20

La cantidad o dosis (por ejemplo, números de células cuando el material de TCR de la invención es una o más células) del material de TCR de la invención administrado debe ser suficiente para provocar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica en el sujeto o animal a lo largo de un intervalo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención debe ser suficiente para unirse a un antígeno de cáncer, o detectar, tratar o prevenir cáncer en un periodo de desde aproximadamente 2 horas o más largo, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de la administración. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo puede ser incluso más largo. La dosis estará determinada por la eficacia del material de TCR de la invención particular y el estado del animal (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

25

30

En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para los fines de la invención, un ensayo, que comprende comparar el grado en el que se someten células diana a lisis o se secreta IFN- γ por células T que expresan el TCR, polipéptido o proteína de la invención tras la administración de una dosis dada de tales células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos a cada uno de los cuales se les administra una dosis diferente de las células T, puede usarse para determinar una dosis inicial que va a administrarse a un mamífero. El grado en el que se someten células diana a lisis o se secreta IFN- γ tras la administración de una determinada dosis puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica.

35

40

La dosis del material de TCR de la invención también estará determinada por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material de TCR de la invención particular. Normalmente, el médico encargado decidirá la dosificación del material de TCR de la invención con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en consideración una variedad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de TCR de la invención que va a administrarse, vía de administración, y la intensidad del estado que está tratándose. En una realización en la que el material de TCR de la invención es una población de células, el número de células administradas por infusión puede variar, por ejemplo, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células o más.

45

Un experto habitual en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR inventivos de la invención pueden modificarse de cualquiera de varias maneras, de tal modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de TCR de la invención se aumenta mediante la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR de la invención pueden conjugarse o bien directa o bien indirectamente a través de un puente a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, materiales de TCR de la invención, a restos de direccionamiento se conoce en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wadwa *et al.*, J. Drug Targeting 3: 111 (1995) y patente estadounidense 5.087.616. El término "resto de direccionamiento" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un receptor de superficie celular, de tal manera que el resto de direccionamiento dirige la administración de los materiales de TCR de la invención a una población de células sobre cuya superficie se expresa el receptor. Los restos de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y cualquier otro ligando natural o no natural, que se unen a receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), etc.). El término "puente" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente o molécula que une los materiales de TCR de la invención al resto de direccionamiento. Un experto habitual en la técnica reconoce que sitios en los materiales de TCR de la invención,

50

55

60

65

que no son necesarios para la función de los materiales de TCR de la invención, son sitios ideales para acoplar un puente y/o un resto de direccionamiento, siempre que el puente y/o resto de direccionamiento, una vez acoplado a los materiales de TCR de la invención, no interfiera con la función de los materiales de TCR de la invención, es decir, la capacidad de unirse a VPH 16 E6; o de detectar, tratar o prevenir cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped o poblaciones de células de la invención pueden usarse en métodos de tratamiento o prevención de cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH. Sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree que los TCR de la invención se unen específicamente a VPH 16 E6, de tal manera que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionado), cuando se expresa por una célula, puede mediar en una respuesta inmunitaria frente a una célula diana que expresa VPH 16 E6. Con respecto a esto, las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, población de células, anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención son para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado en un mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

Los términos “tratar” y “prevenir” así como términos derivados de los mismos, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente el tratamiento o la prevención completo o al 100%. En vez de eso, hay diversos grados de tratamiento o prevención que un experto habitual en la técnica reconoce que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. Con respecto a esto, los métodos descritos en el presente documento pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de un estado en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionado por el método puede incluir tratamiento o prevención de uno o más estados o síntomas del estado, por ejemplo, cáncer, que está tratándose o previniéndose. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención puede incluir fomentar la regresión de un tumor. Además, para los fines en el presente documento, la “prevención” puede abarcar retrasar la aparición del estado, o un síntoma o estado del mismo.

También se proporciona un método de detección de la presencia de un estado en un mamífero. El método comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células, anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas de la invención descritos en el presente documento, formando así un complejo, y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia del estado en el mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

Con respecto al método de detección de la invención de un estado en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de célula completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteínas completas, o una fracción de ácido nucleico.

Para los fines del método de detección de la invención, la puesta en contacto tiene lugar *in vitro* con respecto al mamífero.

Además, la detección del complejo puede producirse mediante cualquiera de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células, o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención descritos en el presente documento, pueden marcarse con una etiqueta detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano), y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

Para los fines de los métodos, en los que se administran células huésped o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas con respecto al mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas con respecto al mamífero.

Con respecto a los métodos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de la orofaringe, cáncer de ovarios, cáncer del pene, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, omento y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino

delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer del útero, cáncer de uréter, y cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferido es cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferido es cáncer positivo para VPH 16. Aunque los cánceres más habitualmente asociados con infección por VPH 16 incluyen cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva y pene, los métodos pueden usarse para tratar cualquier cáncer positivo para VPH 16, incluyendo los que se producen en otras zonas anatómicas.

El mamífero al que se hace referencia en los métodos descritos en el presente documento puede ser cualquier mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden *Rodentia*, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden *Logomorpha*, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden *Carnivora*, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). Se prefiere más que los mamíferos sean del orden *Artiodactyla*, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden *Perssodactyla*, incluyendo equinos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del *Primates*, *Ceboids* o *Simoids* (monos) o del orden *Anthropoids* (seres humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra el aislamiento de TCR anti-VPH 16 humanos a partir de tumor.

Se obtuvo una muestra de un tumor de cáncer anal metastásico positivo para VPH 16 E6 (tumor 3809) a partir de un paciente. Se analizó la muestra de tumor para determinar la expresión de VPH 16 E6, VPH 16 E7, VPH 18 E6 y VPH 18 E7 con respecto a gliceraldehído 3-fosato deshidrogenasa (GAPDH) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de transcriptasa inversa (RT). Se comparó la expresión relativa de VPH 16 E6, VPH 16 E7, VPH 18 E6 y VPH 18 E7 con la de células CaSki, células HeLa y células 624 (línea celular de melanoma). Los resultados se muestran en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, la muestra de tumor 3809 era positiva para la expresión de VPH 16 E6.

Se dividió la muestra de tumor 3809 en 24 fragmentos y se obtuvieron linfocitos de infiltración tumoral (TIL) a partir de los diversos fragmentos. Se cultivaron conjuntamente los TIL en una placa de 96 pocillos con células dendríticas (DC) inmaduras autólogas que se habían pulsado con VPH 16 E6 solo, VPH 16 E6 en combinación con anticuerpo anti-clase I, VPH 16 E7 solo, VPH 16 E7 en combinación con anticuerpo anti-clase I, gp100, u OKT3. Se midió el interferón-gamma (IFN- γ). Los resultados se muestran en las figuras 2A y 2B. Tal como se muestra en las figuras 2A y 2B, los TIL eran reactivos frente a VPH 16 E6 pero no frente a gp100 o E7. La reactividad anti-VPH 16 E6 de los TIL se bloqueó mediante anticuerpo anti-clase I.

Se seleccionaron células a partir de los pocillos de cultivo conjunto reactivos usando perlas magnéticas anti-4-1BB. Se realizó la expansión rápida de los números de células seleccionadas usando el protocolo de expansión rápida (REP) tal como se describió anteriormente (Dudley *et al.* J. Immunother. 26:332-42 (2003) y Riddell *et al.* J. Immunol. Methods 128:189-201 (1990)). En resumen, se cultivaron TIL con células "de alimentación" mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (40 Gy) en medio completo (CM) con anticuerpo anti-CD3 30 ng/ml e IL-2 6000 UI/ml.

Los números expandidos de células seleccionadas mediante 4-1BB de 3809 se cultivaron conjuntamente con células 293-A2 (células HEK-293 con expresión estable de HLA-A2) transfectadas con proteína verde fluorescente (GFP), células 293-A2 transfectadas con E6, línea celular linfoblastoide (LCL) 3809 (células B que se han transformado usando virus de Epstein-Barr) cultivadas sin péptido, LCL 3809 cultivadas conjuntamente con una combinación de péptidos de VPH 16 E6, u OKT3. La combinación de péptidos incluyó péptidos de 15 meros con solapamientos de 11 aminoácidos que cubrían la secuencia completa de VPH 16 E6. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, los números expandidos de TIL eran reactivos frente a células 293-A2 transfectadas con E6 pero no frente a células 293-A2 transfectadas con GFP. Las células LCL 3809 cultivadas conjuntamente con la combinación de péptidos E6 demostraron reactividad mientras que las células LCL 3809 cultivadas conjuntamente sin péptidos no la demostró. Estudios de citometría de flujo mostraron que los números expandidos de células se unían a tetrámero HLA-A2/E6₂₉₋₃₈.

Se seleccionaron adicionalmente células mediante clasificación usando perlas magnéticas anti-4-1BB sin ciclos adicionales de REP o clonación seguido por amplificación rápida de extremos de ADNc en 5' (RACE). En la tabla A se muestra un análisis de genotipo A de los productos de RACE en 5' a partir del aislamiento con perlas magnéticas. Tal como se muestra en la tabla A, se obtuvo una población de células casi clonal.

TABLA A

TRAV	TRAJ	Colonias	TRBV	TRBJ	TRBD	Colonias
TRAV35*02	TRAJ41*01	4	TRBV7-6*01	TRBV2-3*01	TRBD1*01	8

TRAV10*01	TRAJ44*01	3	TRBV14*01	TRBJ1-6*01	TRBD1*01	1
TRAV5*01	TRAJ34*01	1				

Se obtuvo una secuencia de nucleótidos que comprendía ADNc (SEQ ID NO: 21) que codificaba para una cadena alfa que comprendía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 a partir de TRAV35*02/TRAJ41*01. Se obtuvo una secuencia de nucleótidos que comprendía ADNc (SEQ ID NO: 22) que codificaba para una cadena beta que comprendía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 a partir de TRBV7-6*01/TRBV2-3*01/TRBD1*01.

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra un método de preparación de un TCR anti-VPH 16 quimérico que comprende una región variable humana y una región constante de ratón.

Se prepararon de la siguiente manera una secuencia de nucleótidos que codificaba para un TCR quimérico que incluía una región constante de ratón y una región variable humana. Se escindieron las secuencias de nucleótidos que codificaban para las regiones constantes originales (humanas) de las cadenas alfa y beta del TCR obtenido en el ejemplo 1 (secuencias de aminoácidos de región constante de SEQ ID NO: 23 y 24, respectivamente) y se sustituyeron por secuencias de nucleótidos que codificaban para una región constante murina de las cadenas alfa y beta, respectivamente. Se clonaron las secuencias de nucleótidos resultantes que codificaban para las cadenas alfa y beta quiméricas para dar una única secuencia de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos que codificaba para un péptido de picornavirus 2A posicionado entre las cadenas alfa y beta. Se optimizó en cuanto a codones la secuencia de nucleótidos combinada (opt) para la expresión en tejidos humanos para proporcionar un inserto de vector (SEQ ID NO: 29). Se clonó el inserto de vector en un vector de expresión de MSGV1 dando como resultado la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30 (TCR de E6). El TCR codificado por el vector comprendía una cadena alfa que comprendía una secuencia de aminoácidos que comprendía SEQ ID NO: 17 y una cadena beta que comprendía una secuencia de aminoácidos que comprendía SEQ ID NO: 18.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra que linfocitos de sangre periférica (PBL) transducidos con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 reconocen específicamente líneas celulares de tumor positivo para VPH 16 de una manera restringida mediante HLA-A2.

Se transdujeron linfocitos de sangre periférica (PBL) con el vector de expresión del ejemplo 2 y se cultivaron conjuntamente con células 293-A2 diana pulsadas con péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH-18, células de control de melanoma, células de control de colangio, células 624, o células SiHa. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 4A. Tal como se muestra en la figura 4A, PBMC transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 reconocen específicamente líneas celulares de tumor positivo para VPH 16 y otras dianas HLA-A2⁺VPH16⁺ de una manera restringida mediante HLA-A2.

Se cultivaron conjuntamente PBL transducidos con el vector de expresión del ejemplo 2 con células 293-A2 diana transducidas con un plásmido que codifica para E6, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para E6, células SCC90, células CaSki, o células 624 (línea celular de melanoma) sin anticuerpo, con anticuerpo anti-MHC de clase I, o anticuerpo anti-MHC de clase II. Se cultivaron conjuntamente DMF5 (células T transducidas para expresar un TCR restringido mediante MHC de clase I frente a MART-1) con una línea celular de melanoma (624) que se reconoce por DMF5 sin anticuerpo, con anticuerpo anti-MHC de clase I, o anticuerpo anti-MHC de clase II. Se cultivaron 4.7.20 (células T transducidas para expresar un TCR restringido mediante MHC de clase II frente a VPH 16 E7) con PBMC pulsadas con la combinación de péptidos E7 "péptidos E7" sin o anticuerpo, con anticuerpo anti-MHC de clase I, o anticuerpo anti-MHC de clase II. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 4B. Tal como se muestra en la figura 4B, el anticuerpo anti-MHC de clase I bloqueó la reactividad de las células transducidas frente a dianas HLA-A2⁺VPH16⁺, mientras que el anticuerpo anti-clase II no bloqueó la reactividad.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra que células transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 se unen a tetrámero HLA-A2-E6₂₉₋₃₈ de una manera independiente de CD8.

Se clasificaron PBL transducidos con el vector de expresión recombinante del ejemplo 2 en células positivas para CD8 y células negativas para CD8 mediante FACS. Se midió la unión a tetrámero HLA-A2-E6₂₉₋₃₈ mediante citometría de flujo. Las células positivas para CD8 y negativas para CD8 se unieron ambas a tetrámero HLA-A2-E6₂₉₋₃₈.

5 EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra que células positivas para CD4 y CD8 transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 reconocen específicamente líneas celulares de tumor positivo para VPH-16.

PBL positivos para CD8 o positivos para CD4 no se transdujeron (sin transducir) o se transdujeron con el vector de expresión del ejemplo 2 y se cultivaron conjuntamente con células 293-A2 diana pulsadas con péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293-A2, células 624 transducidas con retrovirus que expresan de manera estable VPH 16 E7 (624-E7), células 624 transducidas con retrovirus que expresan de manera estable VPH 16 E6 (624-E6), células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH-18, células de control de melanoma, células 624 o células SiHa. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 5. Tal como se muestra en la figura 5, las PBMC positivas para CD8 y positivas para CD4 transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 reconocen específicamente, ambas de ellas, líneas celulares de tumor positivo para VPH 16 y otras dianas HLA-A2⁺VPH16⁺ de una manera restringida mediante HLA-A2.

25 EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra que células transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 demuestran un reconocimiento ávido de células T2 pulsadas con VPH 16 E6₂₉₋₃₈.

PBL positivos para CD8 o positivos para CD4 no se transdujeron (sin transducir) o se transdujeron con el vector de expresión del ejemplo 2 y se cultivaron conjuntamente con células T2 diana pulsadas con concentraciones variables de péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en las figuras 6A y 6B. Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, células positivas para CD4 y positivas para CD8 transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18 demostraron un reconocimiento ávido de células T2 pulsadas con VPH 16 E6₂₉₋₃₈.

EJEMPLO 7

40 Este ejemplo demuestra un método de tratamiento de cáncer VPH 16⁺ en un paciente humano, que comprende administrar al paciente células T autólogas transducidas para expresar un TCR anti-VPH 16 E6₂₉₋₃₈ que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18.

45 Los pacientes tendrán cáncer VPH-16⁺ recidivante/que no responde al tratamiento o metastásico. Se someterá a prueba una muestra de tejido canceroso para determinar el genotipo de VPH 16 mediante hibridación *in situ* (ISH) o PCR. También se someterá a los pacientes a prueba para determinar la expresión de HLA-A2. Los pacientes habrán tenido un tratamiento de primera línea previo para enfermedad recidivante/que no responde al tratamiento o metastásica, o el paciente habrá rechazado la terapia convencional.

50 Se tratará a los pacientes con ciclofosfamida (60 mg/kg/día por vía intravenosa (i.v.)) en los días -7 y -6 y fludarabina (25 mg/m²/día, i.v.) en los días -5 a -1. Se transducirán PBMC autólogas con el vector de expresión de MSGV1 del ejemplo 2. Los números de células transducidas se expandirán rápidamente tal como se describió anteriormente (Dudley *et al.* J. Immunother. 26:332-42 (2003) y Riddell *et al.* J. Immunol. Methods 128:189-201 (1990)). En resumen, se cultivarán las células con células "de alimentación" mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (40 Gy) en medio completo (CM) con anticuerpo anti-CD3 30 ng/ml e IL-2 6000 UI/ml. Se administrarán números expandidos de células transducidas a los pacientes junto con una dosis alta de interleucina (IL)-2 en el día 0.

60 Se evaluarán las respuestas tumorales objetivas según RECIST (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos) 1.0. Si al menos tres de 18 pacientes responden al tratamiento a los cuatro meses o más tras el tratamiento, se expandirá la cohorte a 35 pacientes. También se evaluará la toxicidad. También se estudiarán estudios inmunológicos (incluyendo, por ejemplo, expansión, persistencia, fenotipo y función de las administradas por infusión).

65 Debe interpretarse que el uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y "al menos uno" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el

singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Debe interpretarse que el uso del término “al menos uno” seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, “al menos uno de A y B”) significa un elemento seleccionado de los elementos indicados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos indicados (A y B), a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a”,) a menos que se indique lo contrario. Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento sirva simplemente como método abreviado de hacer referencia de manera individual a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o términos de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la invención y no suponga una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

Lista de secuencias

20 <110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

<120> RECEPTORES DE CÉLULAS T ANTI-VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO 16 E6

25 <130> 716827

<150> Documento US 61/846.167

30 <151> 15-07-2013

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 158

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Sintética

<400> 1

ES 2 745 472 T3

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
 20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
 35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
 50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
 85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
 100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
 115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu

145

150

155

- 5 <210> 2
- <211> 10
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Sintética
- <400> 2
- Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 1 5 10
- 20 <210> 3
- <211> 5
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Sintética

ES 2 745 472 T3

<400> 3
Ser Ile Phe Asn Thr
1 5
5
<210> 4
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Sintética
<400> 4
Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu
20 1 5
<210> 5
<211> 13
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Sintética
<400> 5
35 Ala Gly His Pro Ser Ser Asn Ser Gly Tyr Ala Leu Asn
1 5 10
<210> 6
40 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
45 <220>
<223> Sintética
50 <400> 6
Ser Gly His Val Ser
1 5
55 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
60 <213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 745 472 T3

<223> Sintética

<400> 7

5 Phe Asn Tyr Glu Ala Gln
1 5

<210> 8

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

20 <400> 8

Ala Ser Ser Ser Gln Thr Gly Ala Arg Thr Asp Thr Gln Tyr
1 5 10

<210> 9

25 <211> 131

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

35 <400> 9

Met Leu Leu Glu His Leu Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp
1 5 10 15

Val Ser Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln
20 25 30

Glu Gly Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn
35 40 45

Thr Trp Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu
50 55 60

ES 2 745 472 T3

Ile Ala Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr
65 70 75 80

Ala Gln Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala
85 90 95

Ser Ile Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly His Pro Ser
100 105 110

Ser Asn Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu
115 120 125

Val Thr Pro
130

<210> 10

5 <211> 135

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

15 <400> 10

Met Gly Thr Ser 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 Thr
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 Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
50 55 60

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

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

Thr Ile Gln Arg Thr Glu Gln Arg Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys Ala
100 105 110

Ser Ser Ser Gln Thr Gly Ala Arg Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
130 135

20 <210> 11

<211> 272

ES 2 745 472 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sintética

10 <400> 11

Met Leu Leu Glu His Leu Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp
1 5 10 15

Val Ser Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln
20 25 30

Glu Gly Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn
35 40 45

Thr Trp Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu
50 55 60

Ile Ala Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr
65 70 75 80

Ala Gln Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala
85 90 95

Ser Ile Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly His Pro Ser
100 105 110

Ser Asn Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu
115 120 125

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

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

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

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

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

ES 2 745 472 T3

195

200

205

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

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

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

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

<210> 12

5 <211> 314

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 12

Met Gly Thr Ser 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 Thr
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 Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
50 55 60

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

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

Thr Ile Gln Arg Thr Glu Gln Arg Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys Ala
100 105 110

Ser Ser Ser Gln Thr Gly Ala Arg Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
115 120 125

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

ES 2 745 472 T3

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

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310

<210> 13

5 <211> 141

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15

<400> 13

His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
20 25 30

ES 2 745 472 T3

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 14

5 <211> 179

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 14

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95

ES 2 745 472 T3

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 15

5 <211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 15

Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile
 20 25 30

Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr
 35 40 45

Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr
 85 90 95

Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser
 100 105 110

Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu

ES 2 745 472 T3

115 120 125

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135

<210> 16

5 <211> 173

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

15 <400> 16

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
 1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
 50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
 65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
 85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
 100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
 130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
 145 150 155 160

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
 165 170

<210> 17

20 <211> 268

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

ES 2 745 472 T3

<220>

<223> Sintética

5

<400> 17

Met Leu Leu Glu His Leu Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp
 1 5 10 15

Val Ser Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln
 20 25 30

Glu Gly Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn
 35 40 45

Thr Trp Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu
 50 55 60

Ile Ala Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr
 65 70 75 80

Ala Gln Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala
 85 90 95

Ser Ile Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly His Pro Ser
 100 105 110

Ser Asn Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu
 115 120 125

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

Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr
 165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly
 180 185 190

Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe
 195 200 205

Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala
 210 215 220

ES 2 745 472 T3

Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln
225 230 235 240

Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
245 250 255

Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265

<210> 18

5 <211> 308

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 18

Met Gly Thr Ser 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 Thr
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 Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
50 55 60

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

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

Thr Ile Gln Arg Thr Glu Gln Arg Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys Ala
100 105 110

Ser Ser Ser Gln Thr Gly Ala Arg Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro
130 135 140

Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln
145 150 155 160

ES 2 745 472 T3

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val
 165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
 180 185 190

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

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

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp
 225 230 235 240

Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala
 245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly
 260 265 270

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

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

Arg Lys Asn Ser
 305

<210> 19

5 <211> 393

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 19

atgctccttg aacatattt aataatcttg tggatgcagc tgacatgggt cagtgggtcaa 60

cagctgaatc agagtcctca atctatgttt atccaggaag gagaagatgt ctccatgaac 120

tgcacttctt caagcatatt taacacctgg ctatggtaca agcaggacct tggggaaggt 180

cctgtcctct tgatagcctt atataaggct ggtgaattga cctcaaattg aagactgact 240

gctcagtttg gtataaccag aaaggacagc ttctgaata tctcagcatc catacctagt 300

gatgtaggca tctacttctg tgctgggcac ccttctcaa attccgggta tgcactcaac 360

ttcggcaaag gcacctcgct gttggtcaca ccc 393

<210> 20

20

<211> 405

ES 2 745 472 T3

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 20

atgggcacca	gtctcctatg	ctgggtggtc	ctgggtttcc	tagggacaga	tcacacaggt	60
gctggagtct	cccagtctcc	caggtacaaa	gtcacaaaga	ggggacagga	tgtagctctc	120
aggtgtgata	caatttcggg	tcatgtatcc	ctttattggt	accgacaggc	cctggggcag	180
ggcccagagt	ttctgactta	cttcaattat	gaagcccaac	aagacaaatc	agggctgccc	240
aatgatcggg	tctctgcaga	gaggcctgag	ggatccatct	ccactctgac	gatccagcgc	300
acagagcagc	gggactcggc	catgtatcgc	tgtgccagca	gctcccagac	aggggcccgc	360
acagatacgc	agtattttgg	cccaggcacc	cggtctgacag	tgctc		405

<210> 21

15 <211> 819

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25 <400> 21

atgctccttg	aacatthatt	aataatcttg	tgatgcagc	tgacatgggt	cagtggtaa	60
cagctgaatc	agagtcctca	atctatgttt	atccaggaag	gagaagatgt	ctccatgaac	120
tgcacttctt	caagcatatt	taacacctgg	ctatggtaca	agcaggaccc	tggggaaggt	180
cctgtcctct	tgatagcctt	atataaggct	ggtgaattga	cctcaaattg	aagactgact	240
gctcagtttg	gtataaccag	aaaggacagc	ttctgaata	tctcagcatc	catacctagt	300
gatgtaggca	tctacttctg	tgctgggcac	ccttcctcaa	attccgggta	tgactcaac	360
ttcggcaaag	gcacctcgct	gttggtcaca	ccccatatcc	agaaccctga	ccctgccgtg	420
taccagctga	gagactctaa	atccagtgc	aagtctgtct	gcctattcac	cgatthtgat	480
tctcaaacia	atgtgtcaca	aagtaaggat	tctgatgtgt	atatcacaga	caaaactgtg	540
ctagacatga	ggtctatgga	cttcaagagc	aacagtgtctg	tggcctggag	caacaaatct	600
gactthgcat	gtgcaaacgc	cttcaacaac	agcattattc	cagaagacac	cttcttcccc	660
agcccagaaa	gttctctgtg	tgtcaagctg	gtcgagaaaa	gctthgaaac	agatacgaac	720
ctaaactthc	aaaacctgtc	agtgattggg	ttccgaatcc	tctcctgaa	agtggccggg	780
tttaactctg	tcatgacgct	gctgctgtgg	tccagctga			819

30 <210> 22

ES 2 745 472 T3

<211> 945

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 22

```

atgggcacca gtctoctatg ctgggtgggc ctgggtttcc tagggacaga tcacacaggt      60
gctggagtct cccagtctcc caggtacaaa gtcacaaaga ggggacagga tgtagctctc      120
aggtgtgatc caatctcggg tcatgtatcc ctttattggt accgacaggc cctggggcag      180
ggcccagagt ttctgactta cttcaattat gaagcccaac aagacaaatc agggctgccc      240
aatgatcggg tctctgcaga gaggcctgag ggatccatct cactctgac gatccagcgc      300
acagagcagc gggactcggc catgtatcgc tgtgccagca gctcccagac aggggcccgc      360
acagatacgc agtattttgg cccaggcacc cggctgacag tgctcgagga cctgaaaaac      420
gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa      480
aaggccacac tgggtgcctt ggccacaggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg      540
tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag      600
cagcccggcc tcaatgactc cagatactgc ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc      660
ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag      720
aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc      780
tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc      840
accatcctct atgagatctt gctaggaag gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc      900
ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag gattccagag gctag                          945

```

15 <210> 23

<211> 426

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25

<400> 23

```

catatccaga accctgacc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag      60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgcacaaag taaggattct      120
gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac      180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc      240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc      300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc      360

```

ES 2 745 472 T3

	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtcc	420
	agctga	426
5	<210> 24	
	<211> 540	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
15	<400> 24	
	gaggacctga aaaacgtggt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag	60
	atctcccaca cccaaaaggc cacactggtg tgcttggcca caggcttcta ccccgaccac	120
	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagaccog	180
	cagccccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg	240
	agggtctcgg ccaccttctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc	300
	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaacctgt caccagatc	360
	gtcagcgccg aggctgggg tagagcagac tgtggettca cctccgagtc ttaccagcaa	420
	ggggtcctgt ctgccacat cctctatgag atcttctag ggaaggccac cttgtatgcc	480
	gtgctggtca gtgccctcgt gctgatggcc atggtcaaga gaaaggattc cagaggctag	540
20	<210> 25	
	<211> 414	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
30	<400> 25	
	gacatccaga acccagaacc tgctgtgtac cagttaaag atcctcggtc tcaggacagc	60
	accctctgcc tgttcaccga ctttgactcc caaatcaatg tgccgaaaac catggaatct	120
	ggaacgttca tcaactgaaa aactgtgctg gacatgaaag ctatggattc caagagcaat	180
	ggggccattg cctggagcaa ccagacaagc ttcacctgcc aagatatctt caaagagacc	240
	aacgccacct accccagttc agacgttccc tgtgatgcca cgttgactga gaaaagcttt	300
	gaaacagata tgaacctaaa ctttcaaaac ctgtcagtta tgggactccg aatcctcctg	360
	ctgaaagtag ccggatttaa cctgctcatg acgctgaggc tgtggtccag ttga	414
35	<210> 26	
	<211> 522	

ES 2 745 472 T3

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 26

gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag	60
attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttggcca ggggcttctt ccctgaccac	120
gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggtcag cacggaccct	180
caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct	240
accttctggc acaatcctcg caaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca	300
gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag	360
gcctggggcc gagcagactg tgggattacc tcagcatcct atcaacaagg ggtcttgtct	420
gccaccatcc tctatgagat cctgctaggg aaagccaccc tgtatgctgt gcttgtcagt	480
acactggtgg tgatggctat ggtcaaaaga aagaattcat ga	522

15 <210> 27

<211> 807

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25 <400> 27

ES 2 745 472 T3

```

atgctccttg aacatattt aataatcttg tggatgcagc tgacatgggt cagtgggtcaa      60
cagctgaatc agagtcctca atctatgttt atccaggaag gagaagatgt ctccatgaac      120
tgcacttctt caagcatatt taacacctgg ctatggtaca agcaggacc cggggaaggt      180
cctgtcctct tgatagcctt atataaggct ggtgaattga cctcaaatgg aagactgact      240
gctcagtttg gtataaccag aaaggacagc ttctgaata tctcagcatc catacctagt      300
gatgtaggca tctacttctg tgctgggcac ccttcctcaa attccgggta tgcactcaac      360
ttcggcaaag gcacctcgct gttggtcaca cccgacatcc agaaccaga acctgctgtg      420
taccagttaa aagatcctcg gtctcaggac agcaccctct gcctgttcac cgactttgac      480
tcccaaatca atgtgccgaa aaccatggaa tctggaacgt tcatcactga caaaactgtg      540
ctggacatga aagctatgga ttccaagagc aatggggcca ttgcctggag caaccagaca      600
agcttcacct gccaaagatat cttcaaagag accaacgcca cctaccccag ttcagacgtt      660
ccctgtgatg ccacgttgac tgagaaaagc tttgaaacag atatgaacct aaactttcaa      720
aacctgtcag ttatgggact ccgaatcctc ctgctgaaag tagccggatt taacctgctc      780
atgacgctga ggctgtggtc cagttga                                          807

```

<210> 28

5 <211> 927

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

15 <400> 28

ES 2 745 472 T3

atgggcacca gtctcctatg ctgggtggtc ctgggtttcc tagggacaga tcacacaggt 60
gctggagtct cccagtctcc caggtacaaa gtcacaaaaga ggggacagga tgtagctctc 120
aggtgtgatc caatttcggg tcatgtatcc ctttattggt accgacaggc cctggggcag 180
ggcccagagt ttctgactta cttcaattat gaagcccaac aagacaaatc agggctgccc 240
aatgatcggg tctctgcaga gaggcctgag ggatccatct ccaactctgac gatccagcgc 300
acagagcagc gggactcggc catgtatcgc tgtgccagca gctcccagac agggggcccgc 360
acagatacgc agtattttgg cccaggcacc cggetgacag tgctcgagga tctgagaaat 420
gtgactccac ccaaggtctc cttgtttgag ccatcaaaag cagagattgc aaacaaacia 480
aaggctaccc tcgtgtgctt ggccaggggc ttcttcocctg accacgtgga gctgagctgg 540
tgggtgaatg gcaaggaggt ccacagtggg gtcagcacgg accctcaggc ctacaaggag 600
agcaattata gctactgcct gagcagccgc ctgagggtct ctgctacctt ctggcacaat 660
cctcgcaacc acttccgctg ccaagtgcag ttccatgggc tttcagagga ggacaagtgg 720
ccagagggtc cacccaaacc tgtcacacag aacatcagtg cagaggcctg gggccgagca 780
gactgtggga ttacctcagc atcctatcaa caaggggtct tgtctgccac catcctctat 840
gagatcctgc tagggaaagc caccctgtat gctgtgcttg tcagtacact ggtggtgatg 900
gctatggtca aaagaaagaa ttcatga 927

<210> 29

5 <211> 1815

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 29

atggcccttg aacatctggt gataaactg tggatgcaac ttacctgggt atctggtcag 60
caattgaacc agtctccaca gtccatgttt atccaagaag gggaggacgt gtccatgaat 120
tgtacaagct ccagtatcct caacacgtgg ctgtggtaca aacaggatcc tggggaagga 180
ccagtactgt tgatagccct ctataaggcg ggcgaactga catccaatgg aagactcaca 240
gcccaattcg gaattaccgg gaaggattct ttctcaaca tctocgcgag tattccatct 300
gatgtaggaa tatacttctg tgcagggcat ccgtctagca acagtggata tgcctcaat 360
tttgaaagg gcacctccct gctggttacc ccagacattc agaaccccga accagccgta 420
tatcagttga aggacccaag atctcaggat agtacactct gtttgtttac ggactttgac 480

ES 2 745 472 T3

tcacaaatca acgtcccga gactatggaa agtggtagct tcatcacaga taagacggtt 540
ctggacatga aggctatgga ctcaaagagc aacggggcaa ttgcttggtc caaccagaca 600
agctttacct gtcaggacat ttttaaggag actaatgcta cttatccctc cagcgacggt 660
ccgtgtgatg cgactcttac cgagaagtct tttgagaccg atatgaatct caacttccag 720
aatctgtcag tgatgggtct ggggatcctg cttctgaagg ttgcaggatt caatcttctt 780
atgactctcc ggctctggtc ttcaagagcc aaaagaagtg gttctggcgc gacgaatfff 840
agtttgctta agcaagccgg agatgtggag gaaaatcctg gaccgatggg cacaagtttg 900
ctgtgtctggg ttgtgttggg ctttctgggt acagatcata ctggggcggg agtctctcaa 960
agccccgat acaaagtcac taaaagaggg caggatgtcg cgcttcgctg tgatcccatt 1020
agcgggcatg tctcccttta ttggtaccgg caggctttgg gacaaggacc ggagttcctc 1080
acttacttca actacgaagc gcagcaggac aagtccggtc tgcctaata tagattcagc 1140
gccgagagac cggagggcag tatctctact cttacgatac aaagaacgga gcagcgagac 1200
tctgctatgt atagatgtgc aagttctagc cagacgggtg ctgcgacgga cactcaatat 1260
ttcggctctg gtacaagatt gaccgtcttg gaggatctcc ggaacgtcac cccaccaaaag 1320
gtcagtttgt ttgagccatc aaaggcggag atcgccaaca aacagaaagc tacgctcgtg 1380
tgtttggtctc ggggcttctt cccagaccac gtagaacttt cctggtgggt caatggaaag 1440
gaggttcatt ccggagtgtc cactgatccc caagcgtaca aggaatcaa ctatagctac 1500
tgtctctcat ctcggtctcg ggtgagtgcg acattctggc ataatcctcg gaaccacttt 1560
cgatgccaaag tgcagtttca tgggttgagc gaggaagaca agtggcccga gggcagtcct 1620
aaaccagtca ctcaaaacat aagcgcggag gcatggggta gagccgattg tgggattact 1680
agcgttctat accaacaagg ggtattgagc gctacaattc ttacgaaat tctcctcggc 1740
aaggcgacgc tctacgccgt actggtgtct actctcgtgg ttatggcaat ggtgaaacgg 1800
aaaaacagct aatga 1815

<210> 30

5 <211> 7325

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintética

15 <400> 30

ccatggccct tgaacatctg ttgataatac tgtggatgca acttacctgg gtatctggtc 60
agcaattgaa ccagtctcca cagtccatgt ttatccaaga aggggaggac gtgtccatga 120
attgtacaag ctccagtatc ttcaacacgt ggctgtggta caaacaggat cctggggaag 180

ES 2 745 472 T3

gaccagtact gttgatagcc ctctataagg cgggcgaact gacatccaat ggaagactca 240
cagcccaatt cggaattacc cggaaggatt ctttcctcaa catctccgcy agtattccat 300
ctgatgtagg aatatacttc tgtgcagggc atccgtctag caacagtgga tatgccctca 360
atthtgaaa gggcacctcc ctgctggta cccagacat tcagaacccc gaaccagccg 420
tatatcagtt gaaggacca agatctcagg atagtacact ctgthtgttt acggactttg 480
actcaciaat caacgtcccg aagactatgg aaagtgtac gttcatcaca gataagacgg 540
ttctggacat gaagctatg gactcaaaga gcaacggggc aattgcttg tccaaccaga 600
caagctttac ctgtcaggac atthttaagg agactaatgc tacttatccc tccagcgacg 660
ttccgtgtga tgcgactctt accgagaagt cthttgagac cgatatgaat ctcaacttcc 720
agaatctgtc agtgatgggt ctgcygatcc tgcttctgaa ggttgcygga ttcaatcttc 780
ttatgactct ccggtctggt tcttcaagag ccaaaagaag tggthtctggc gcgacgaatt 840
ttagthtgtc taagcaagcc ggagatgtgg aggaaaatcc tggaccgatg ggcacaagtt 900
tgctgtgctg ggttgtgttg ggctthtctg gtacagatca tactggggcy ggagtctctc 960
aaagccccg atacaaagtc actaaaagag ggcaggatgt cygcttctgc tgtgatccca 1020
ttagcgggca tgtctccctt tattgttacc ggcaggcttt gggacaagga ccggagttec 1080
tcacttactt caactacgaa gcgcygcagg acaagtccgg tctgcctaata gatagattca 1140
gcgcccagag accggagggc agtatctcta ctcttactgat acaaagaacy gacgcygcgag 1200
actctgctat gtatagatgt gcaagttcta gccagacygg tgctcgcacy gacactcaata 1260
atthcggctc tgggtacaaga ttgacctct tggaggatct ccggaacgtc accccaccaa 1320
aggctcagtht gthttgagcca tcaaaggcyg agatcgcaa caaacagaaa gctacyctcy 1380
tgtgtthtgc tcygggcttc tcccagacc acgtagaact thctctggtg gtcaatggaa 1440
aggagthtca thccggagtg tccactgatc ccaagcygta caaggaatcc aactatagct 1500
actgtctctc atctcggctc cygggtgagt cygacattctg gcataatcct cyggaacct 1560
thctgatcca agtgcygtht catgggttga gcgaggaaga caagtggccc gagggcygct 1620
ctaaaccagt cactcaaac ataaagcycc aggcacyggg tagagccgat tgtgggatta 1680
ctagcycttc ataccaacia ggggtattga gcgctacaa thctttacya atthctctcy 1740
gcaagcygac gctctacycc gtactggtgt ctactctctg gthtatggca atggtgaaac 1800
ggaaaaacyc ctatgagaa thctgcygct gacygtaccy cyggccccgg atccgataaa 1860
ataaaagatt thatttagtc thcagaaaa ggggggaaatg aaagacccca cctgtaggtt 1920
tggcaagcta gcttaagtaa cyccattht caaggcyggt aaaaacata actgagaata 1980
gagaagthca gatcaaggth aggaacygag agacygcaga atatgggcca aacygatat 2040
ctgtggtaa cygthctctc cccggtcyg gccaagaac agatggtccc cagatcyggt 2100

ES 2 745 472 T3

cccgccctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc agggtgcccc aaggacctga 2160
 aatgacctt gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgctc 2220
 gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tcactcggcg cgccagtcct 2280
 ccgatagact gcgtcgcccc ggtaccctgtg tatccaataa accctcttgc agttgcatcc 2340
 gacttggtgt ctogctgttc cttgggaggg tctcctctga gtgattgact acccgtcagc 2400
 gggggctctt catgggtaac agtttcttga agttggagaa caacattctg agggtaggag 2460
 tcgaatatta agtaatcctg actcaattag ccactgtttt gaatccacat actccaatac 2520
 tcctgaaatc catcgatgga gttcattatg gacagcgcag aaagagctgg ggagaattgt 2580
 gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 2640
 cctggggctc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgctgctc ctgcccgtt 2700
 tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 2760
 gcggtttgct tattggcgctc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtc cgctcgtc 2820
 ttcggtcgcg gcgagcggta tcagctcact caaagcgggt aatcgggta tccacagaat 2880
 caggggataa cgcagaaaag aacatgtgag caaaaaggcca gcaaaaaggcc aggaaccgta 2940
 aaaagcccg gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 3000
 atcgacgctc aagtcagagtg tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3060
 cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt 3120
 ccgctttctt cccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt aggtatctca 3180
 gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 3240
 accgctcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtgaga cactgctat 3300
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 3360
 cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 3420
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 3480
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 3540
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 3600
 actcacgta agggatcttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 3660
 taaatataaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca 3720
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca 3780
 tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 3840
 ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 3900
 accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctcctg aactttatcc gcctccatcc 3960

ES 2 745 472 T3

agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 4020
 acgttgttgc cattgctaca ggcacgtagg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat 4080
 tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag 4140
 cggtagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 4200
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4260
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt 4320
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcccaca tagcagaact ttaaaagtgc 4380
 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 4440
 ccagttcgat gtaaccactc cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 4500
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga 4560
 cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 4620
 gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 4680
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga 4740
 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccttttgg tctcgcgcgt ttcggtgatg 4800
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 4860
 atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct 4920
 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtaaa 4980
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcagggc ccattcgcca ttcaggctgc 5040
 gcaactgttg ggaagggcga tcgggtcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag 5100
 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 5160
 gtaaaacgac ggcgcaagga atgggtgcatg caaggagatg gcgcccaaca gtccccggc 5220
 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc 5280
 ccgatcttcc ccatcgggta tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc 5340
 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggcgatta gtccaatttg ttaaagacag 5400
 gatatacagt gtccaggctc tagttttgac tcaacaatat caccagctga agcctataga 5460
 gtacgagcca tagataaaat aaaagatfff atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa 5520
 agacccacc tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa 5580
 aatacataac tgagaataga gaagttcaga tcaaggttag gaacagagag acagcagaat 5640
 atgggcaaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag 5700
 atggtcccca gatgcggctc cgcctcagc agtttctaga gaaccatcag atgtttccag 5760
 ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg ccttatttga actaaccaat cagttcgctt 5820
 ctgccttctg ttcgcgcgct tctgctcccc gagctcaata aaagagccca caaccctca 5880

ES 2 745 472 T3

ctcggcgcgc cagtccctccg atagactgcg tcgcccgggt acccgtattc ccaataaagc 5940
ctcttgctgt ttgcatccga atcgtggact cgctgatcct tgggagggtc tcctcagatt 6000
gattgactgc ccacctcggg ggtctttcat ttggagggtc caccgagatt tggagacccc 6060
tgcccagga ccaccgaccc ccccgccggg aggtaagctg gccagcggc gtttcgtgtc 6120
tgtctctgtc tttgtgctg tttgtgccg catctaagt ttgocctgc gtctgtacta 6180
gtagctaac tagctctgta tctggcggac ccgtgggga actgacgagt tcggaacacc 6240
cggccgcaac cctgggagac gtcccagga cttcggggc cgtttttgtg gcccgacctg 6300
agtcctaaaa tcccgatcgt ttaggactct ttggtgcacc ccccttagag gagggatatg 6360
tggttctggt aggagacgag aacctaanaac agttcccgcc tccgtctgaa tttttgcttt 6420
cggtttggga ccgaagccgc gccgcgcgct ttgtctgctg cagcatcgtt ctgtgtgctc 6480
tctgtctgac tgtgtttctg tatttctctg aaaatatggg cccgggctag cctgttacca 6540
ctcccttaag tttgacctta ggtcactgga aagatgtcga gcggatcgt cacaaccagt 6600
cggtagatgt caagaagaga cgttgggta ccttctgctc tgcagaatgg ccaacctta 6660
acgtcggatg gccgcgagac ggcacctta accgagacct catcaccag gttaagatca 6720
aggtcttttc acctggccc catggacacc cagaccaggt cccctacatc gtgacctggg 6780
aagccttggc tttgacccc cctccctggg tcaagcctt tgtacaccct aagcctccgc 6840
ctcctcttcc tccatccgcc ccgtctctcc ccctgaacc tcctcgttcg accccgcctc 6900
gatcctccct tcatccagcc ctcaactcct ctctaggcgc ccccatatgg ccatatgaga 6960
tcttatatgg ggcacccccg ccccttgtaa acttccctga ccctgacatg acaagagtta 7020
ctaacagccc ctctctccaa gctcacttac aggctctcta cttagtccag cacgaagtct 7080
ggagacctct ggcgagacc taccaagaac aactggaccg accggtggtta cctcacctt 7140
accgagtcgg cgacacagt tgggtccgcc gacaccagac taagaaccta gaacctcgt 7200
ggaaagacc ttacacagtc ctgctgacca cccccaccg cctcaaagta gacggcatcg 7260
cagcttgat acacgccgcc cacgtgaagg ctgccgacc cgggggtgga ccatccteta 7320
gaccg 7325

<210> 31

5 <211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintética

15 <400> 31

agcatattta acacc 15

<210> 32

20

<211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sintética
 <400> 32
 10 ttatataagg ctgggaatt g 21
 <210> 33
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sintética
 25 <400> 33
 gctgggcacc cttcctcaaa ttccgggtat gcactcaac 39
 <210> 34
 30 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 40 <400> 34
 tcgggtcatg tatcc 15
 45 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Sintética
 <400> 35
 ttcaattatg aagcccaa 18
 60 <210> 36
 <211> 42
 65 <212> ADN

ES 2 745 472 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sintética

<400> 36

gccagcagct cccagacagg ggccccgaca gatacgcagt at 42

10 <210> 37

<211> 27

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Sintética

<400> 37

Arg	Ala	Lys	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys
1			5					10						15	

Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro
		20					25			

25 <210> 38

<211> 393

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Sintética

<400> 38

40 atggcccttg aacatctggt gataaactg tggatgcaac ttacctgggt atctggtcag 60

caattgaacc agtctccaca gtccatgttt atccaagaag gggaggacgt gtccatgaat 120

tgtacaagct ccagtatctt caacacgtgg ctgtggtaca aacaggatcc tggggaagga 180

ccagtactgt tgatagccct ctataaggcg ggcgaactga catccaatgg aagactcaca 240

gcccaattcg gaattaccgg gaaggattct ttcctcaaca tctccgcgag tattccatct 300

gatgtaggaa tatacttctg tgcagggcat ccgtctagca acagtggata tgcctcaat 360

tttgaaagg gcacctccct gctggttacc cca 393

<210> 39

45 <211> 405

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

ES 2 745 472 T3

<220>

<223> Sintética

5 <400> 39

atgggcacaa gtttgctgtg ctgggttggtg ttgggctttc tgggtacaga tcatactggg	60
gcgggagtct ctcaaagccc ccgatacaaa gtcactaaaa gagggcagga tgtcgcgctt	120
cgctgtgatc ccattagcgg gcatgtctcc ctttattggt accggcaggc tttgggacaa	180
ggaccggagt tcctcactta cttcaactac gaagcgcagc aggacaagtc cggctctgct	240
aatgatagat tcagcgccga gagaccggag ggcagtatct ctactcttac gatacaaaga	300
acggagcagc gagactctgc tatgtataga tgtgcaagtt ctagccagac gggtgctcgc	360
acggacactc aatatttcgg tcctggtaca agattgaccg tcttg	405

REIVINDICACIONES

1. Receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica por virus del papiloma humano (VPH) 16 E6 y que comprende una región variable humana y una región constante murina, en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8, y opcionalmente en el que:
 - (i) el TCR tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6₂₉₋₃₈ que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 - (ii) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 16;
 - (iii) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18; y/o
 - (iv) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.
2. TCR aislado o purificado que tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6 y que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8, opcionalmente en el que el TCR comprende:
 - (i) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10;
 - (ii) SEQ ID NO: 13 y 14; o
 - (iii) SEQ ID NO: 11 y 12.
3. Polipéptido aislado o purificado que comprende una parte funcional del TCR según la reivindicación 1 ó 2, en el que la parte funcional se une específicamente a VPH 16 E6 y comprende las secuencias de aminoácidos de
 - (i) SEQ ID NO: 3-8;
 - (ii) SEQ ID NO: 9 y 10; o
 - (iii) SEQ ID NO: 11 y 12.
4. Polipéptido según la reivindicación 3 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18.
5. Proteína aislada o purificada que comprende las secuencias de aminoácidos según la reivindicación 3, opcionalmente en la que la proteína comprende:
 - (i) una primera cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8;
 - (ii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o
 - (iii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12
 opcionalmente en la que la proteína es una proteína de fusión y/o un anticuerpo recombinante.
6. Proteína según la reivindicación 5, en la que la proteína comprende una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, opcionalmente en la que la proteína es una proteína de fusión y/o un anticuerpo recombinante.
7. Ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR según la reivindicación 1 ó 2, el polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, o la proteína según la reivindicación 5 ó 6, opcionalmente en el que el ácido nucleico comprende:
 - (i) las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 31-36 o (b) SEQ ID NO: 19 y 20; o
 - (ii) las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 21 y 22 o (b) SEQ ID NO: 27 y 28,
 opcionalmente en el que el ácido nucleico comprende además las secuencias de nucleótidos de (a)

SEQ ID NO: 23 y 24 o (b) SEQ ID NO: 25 y 26, y

opcionalmente en el que la secuencia de nucleótidos está optimizada en cuanto a codones, en el que la secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones comprende opcionalmente las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 38 y 39.

8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico comprende:

(i) las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 31-36 o (b) SEQ ID NO: 19 y 20; o

(ii) las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 21 y 22 o (b) SEQ ID NO: 27 y 28,

opcionalmente en el que el ácido nucleico comprende además las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 23 y 24 o (b) SEQ ID NO: 25 y 26, y

opcionalmente en el que la secuencia de nucleótidos está optimizada en cuanto a codones, en el que la secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones comprende opcionalmente las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 38 y 39.

9. Vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, que comprende opcionalmente la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30.

10. Célula huésped aislada que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, opcionalmente en la que la célula es humana.

11. Población de células que comprende al menos una célula huésped según la reivindicación 10.

12. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una parte funcional del TCR según la reivindicación 1 ó 2, en el que la parte funcional comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

13. Composición farmacéutica que comprende el TCR según la reivindicación 1 ó 2, el polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, la proteína según la reivindicación 5 ó 6, el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, la célula huésped según la reivindicación 10, la población de células según la reivindicación 11, o el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 12, y un portador farmacéuticamente aceptable.

14. Método de detección de la presencia de un estado en un mamífero, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con el TCR según la reivindicación 1 ó 2, el polipéptido según 3 ó 4, la proteína según la reivindicación 5 ó 6, el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, la célula huésped según la reivindicación 10, la población de células según la reivindicación 11, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 12, o la composición farmacéutica según la reivindicación 13, formando así un complejo, y

(b) detectar el complejo, en el que detección del complejo es indicativa de la presencia del estado en el mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH,

opcionalmente en el que el estado es:

(i) cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene y/o

(ii) un cáncer positivo para VPH 16.

15. TCR según la reivindicación 1 ó 2, polipéptido según la reivindicación 3 ó 4, proteína según la reivindicación 5 ó 6, ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, célula huésped según la reivindicación 10, población de células según la reivindicación 11, anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 12, o composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado en un mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH,

opcionalmente en el que el estado es:

(i) cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene; y/o

(ii) un cáncer positivo para VPH 16.

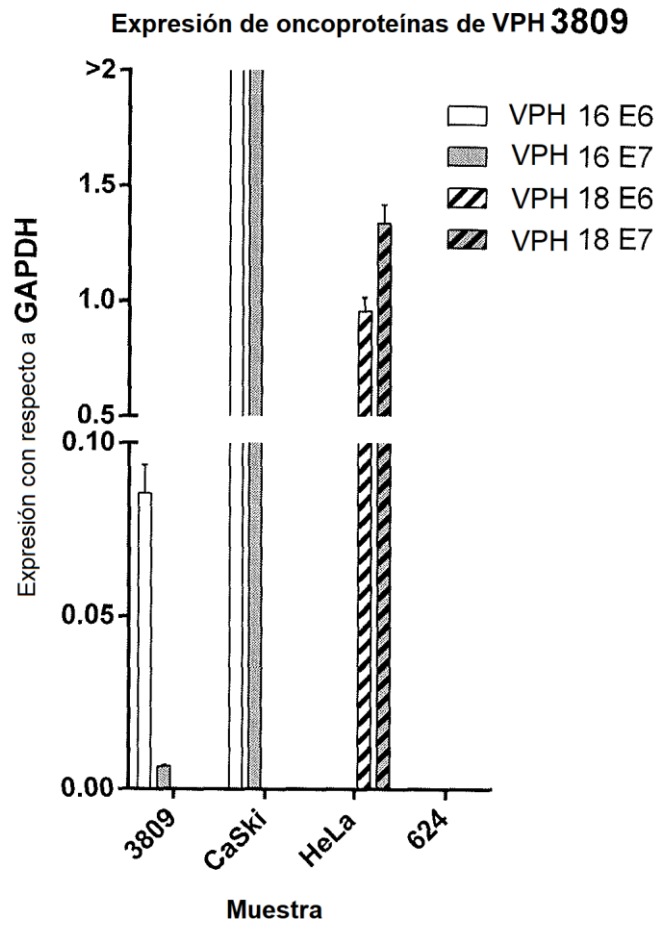


FIG. 1

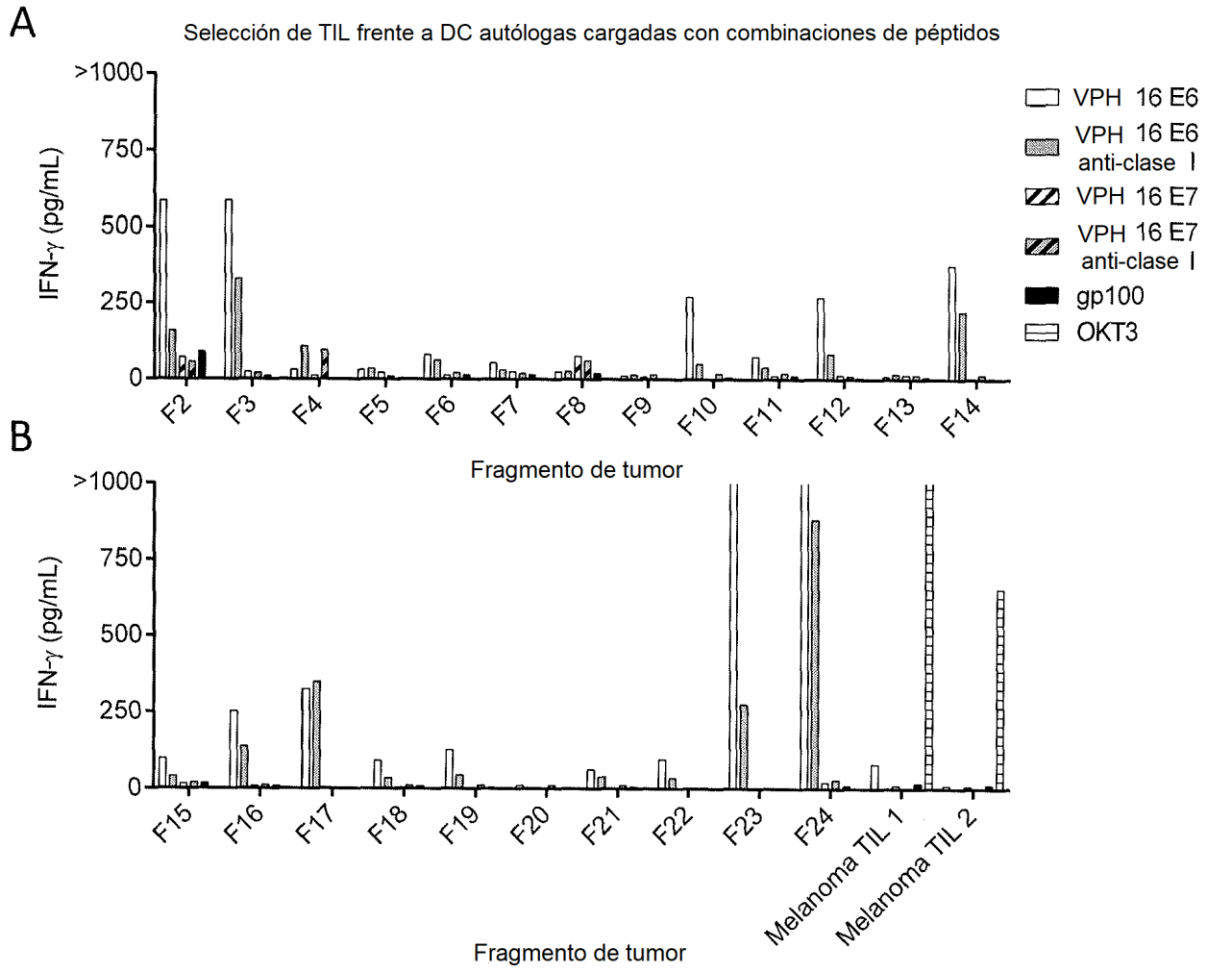
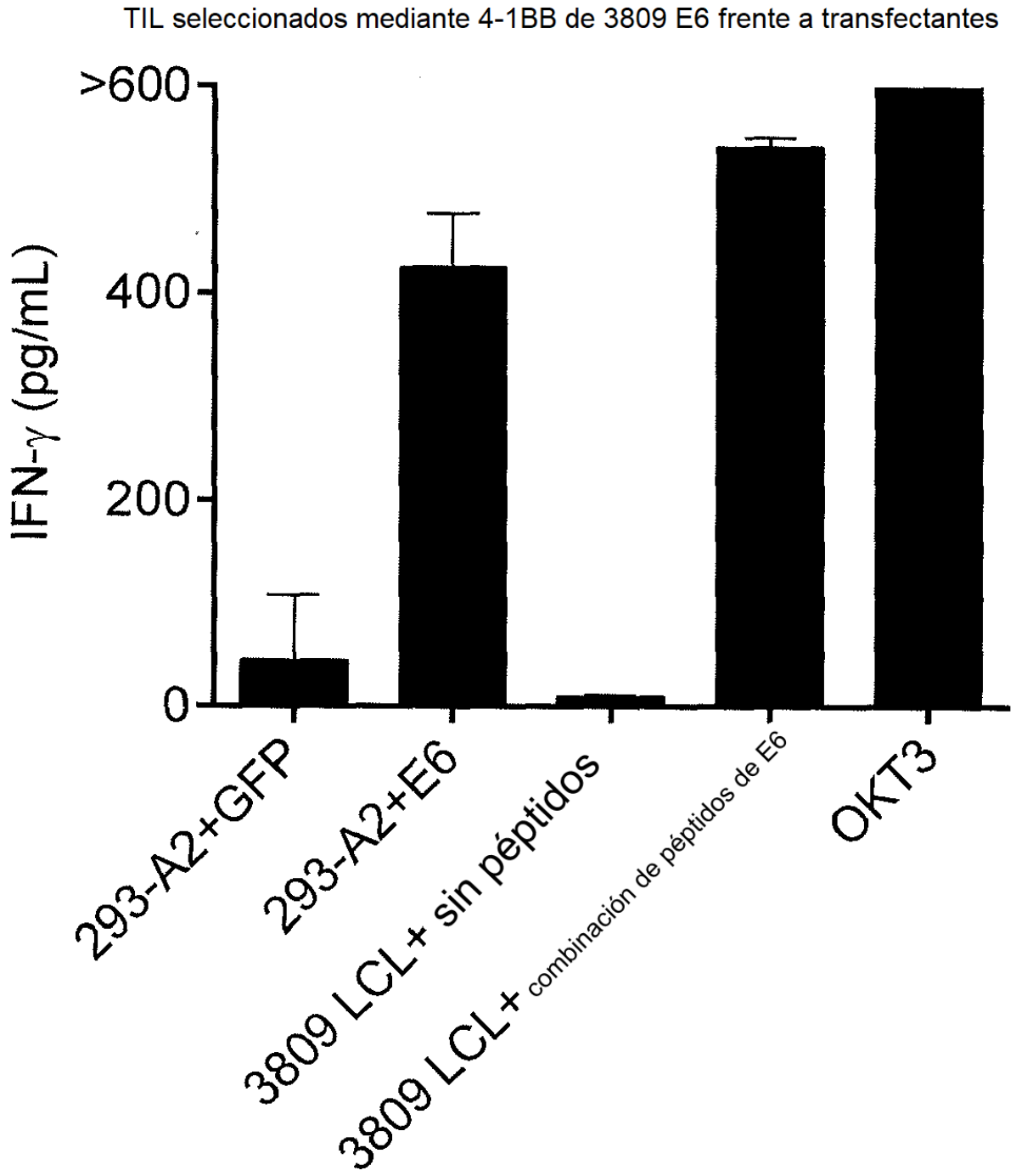


FIG. 2



Célula diana + plásmido o combinación de péptidos

FIG. 3

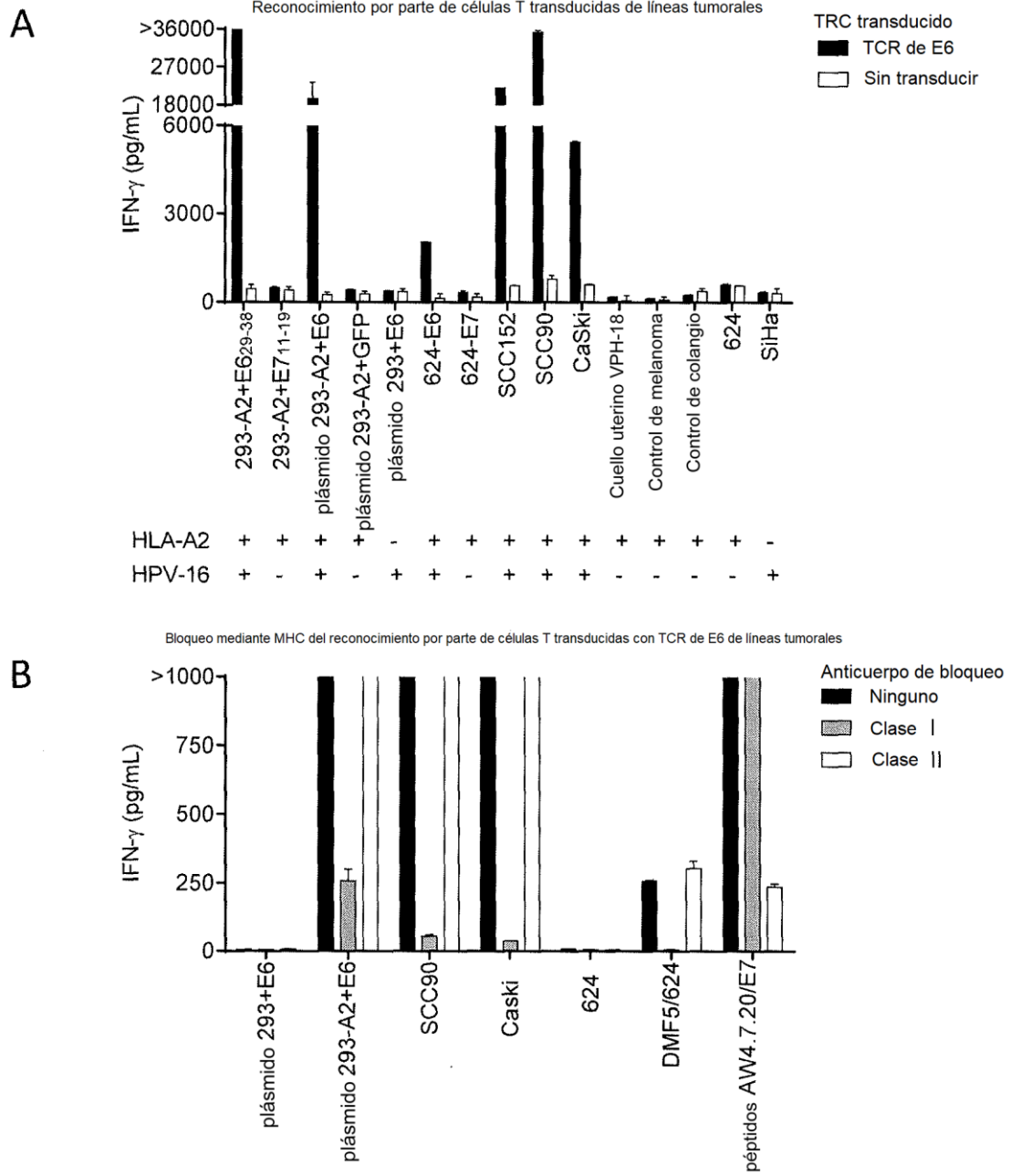


FIG. 4

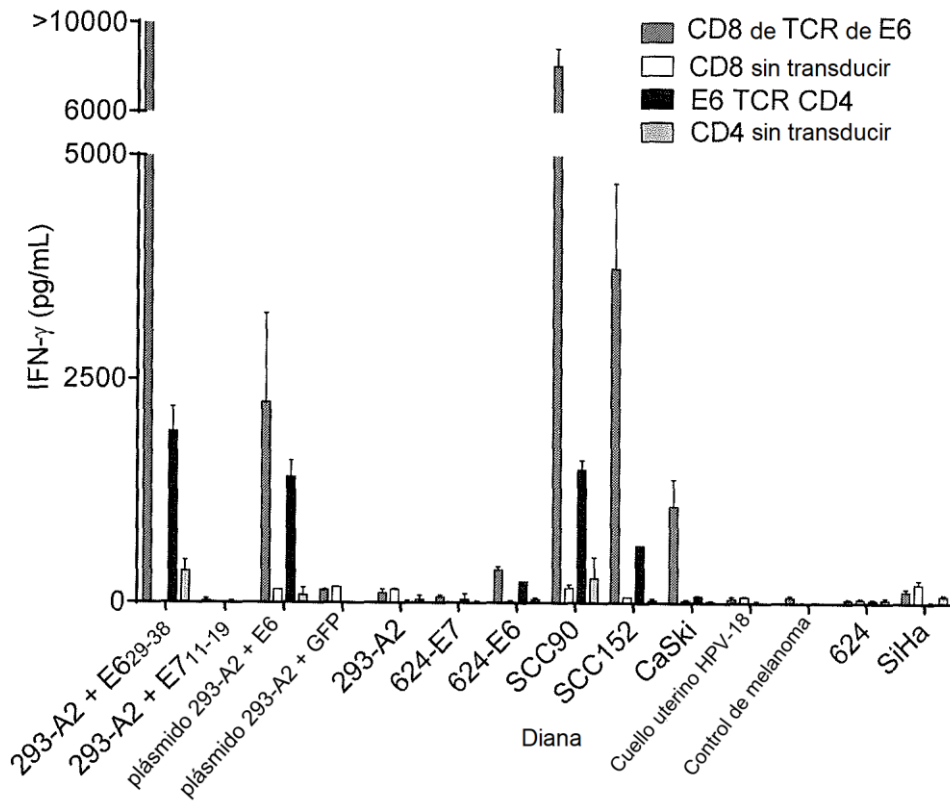


FIG. 5

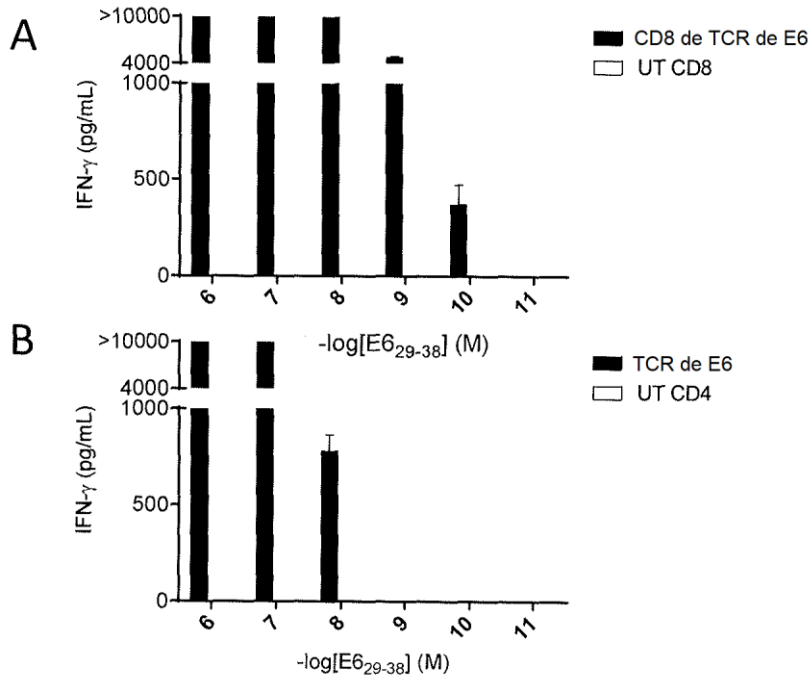


FIG. 6