

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 237**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/US2015/033129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15184228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15729004 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3149031**

54 Título: **Receptores de células T anti-papilomavirus 16 E7 humano**

30 Prioridad:

29.05.2014 US 201462004335 P

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

23.09.2020

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)**

**Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 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 2 784 237 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-papilomavirus 16 E7 humano

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/004.335, presentada el 29 de mayo de 2014.

10 **Incorporación por referencia del material presentado electrónicamente**

Se incorpora por referencia en su totalidad en el presente documento un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador presentado de manera simultánea con el presente documento e identificado de la siguiente manera: un archivo ASCII (texto) de 78.607 Bytes titulado "720940_ST25.TXT", con fecha de 28 de mayo de 2015.

Antecedentes de la invención

20 El motivo principal de algunos tipos de cáncer tal como, por ejemplo, cáncer de cuello uterino, es la infección por papilomavirus humano (HPV). A pesar de los avances en los tratamientos tal como quimioterapia, puede ser malo el pronóstico para muchos cánceres, incluyendo cánceres asociados a HPV. Por consiguiente, existe la necesidad insatisfecha de tratamientos adicionales para cáncer, particularmente cánceres asociados a HPV.

Breve resumen de la invención

25 La presente invención se refiere a receptores de células T, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped, población de células, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, composiciones farmacéuticas y métodos *in vitro* de detección de la presencia de un estado en un mamífero tal como se definen por el contenido de las reivindicaciones.

30 Una realización de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) que comprende una región variable humana y una región constante murina, o una variante funcional del TCR, en el que el TCR y la variante funcional comprenden la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, y tienen especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16 E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2.

40 Una realización adicional de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, y que tiene especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16 E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2, en el que opcionalmente el TCR:

- 45
1. (i) comprende una región constante humana; y/o
 - 50 2. (ii) comprende las secuencias de aminoácidos de (a) SEQ ID NO: 9 y (b) SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 es Ala o Gly.

La invención proporciona adicionalmente polipéptidos y proteínas relacionados, así como ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinante relacionados, células huésped relacionadas y poblaciones de células relacionadas. Adicionalmente se proporcionan por la invención anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas que se refieren a los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) de la invención.

60 Adicionalmente se proporciona por la invención un método *in vitro* de detección de la presencia de un estado en un mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV. 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 de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células huésped, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, formando de este modo un complejo, y

65 (ii) 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 HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.

La invención proporciona adicionalmente cualquiera de los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas definidos por el contenido de las reivindicaciones, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas definidos por el contenido de las reivindicaciones, o cualquier célula huésped o población de células huésped que comprenden un vector recombinante que codifica para cualquiera de los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas definidos por el contenido de las reivindicaciones, eficaz para su uso para tratar o prevenir el estado en un mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de barras que muestra el interferón (IFN)- γ (pg/ml) secretado por linfocitos de sangre periférica (PBL) que se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codifica para un TCR quimérico anti-HPV 16 E7 (barras sombreadas) en el cocultivo con células 293-A2 diana sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Alb, células Panc1 o células SiHa. La expresión de HLA-A2 y HPV-16 E7 por cada célula diana se indica en el fondo de la figura 1 (“+” indica positivo para la expresión y “-” indica negativo para la expresión). Se usaron células no transducidas (barras no sombreadas) como control negativo.

Las figuras 2A-2R son gráficos de puntos que muestran el porcentaje de células de un primer donante (A-I) o un segundo donante (J-R) que se transdujeron (B-I y K-R) con uno de los vectores de expresión recombinante expuestos en la tabla 1 que expresaron lo siguiente: HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ tetrámero⁺/m TRBC⁻ (cuadrante izquierdo superior), HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ tetrámero⁺/m TRBC⁺ (cuadrante derecho superior), HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ tetrámero⁻/m TRBC⁻ (cuadrante izquierdo inferior) y HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ tetrámero⁻/m TRBC⁺ (cuadrante derecho inferior). Los porcentajes numéricos para cada cuadrante se proporcionan encima de cada gráfico de puntos. Se usaron células no transducidas (A y J) como control negativo.

Las figuras 3A y 3B son gráficos que muestran la secreción de IFN- γ por células efectoras de donante 1 (A) o donante 2 (B) que se transdujeron con uno de los vectores de expresión recombinante expuestos en la tabla 1 en el cocultivo con células 624, CaSki, SCC90 o SCC152 diana. Para cada línea de células diana, las barras sombreadas (de izquierda a derecha) corresponden a células efectoras transducidas con el siguiente vector: TCR quimérico anti-HPV 16 E7 (α/β), TCR modificado con Cys (α/β), TCR modificado con LVL (α/β), TCR modificado con LVL-Cys (α/β), TCR quimérico anti-HPV 16 E7 (β/α), TCR modificado con Cys (β/α), TCR modificado con LVL (β/α) o TCR modificado con LVL-Cys (β/α). Se usaron células no transducidas (barras no sombreadas) como control negativo.

La figura 4 es un gráfico que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL que se transdujeron con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con LVL (β/α) (SEQ ID NO: 37) (barras sombreadas) en el cocultivo con células 293-A2 diana sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Ane, células Alb, células Panc1 o células SiHa. La expresión de HLA-A2 y HPV-16 E7 por cada célula diana se indica en el fondo de la figura 4 (“+” indica positivo para la expresión y “-” indica negativo para la expresión). Se usaron células no transducidas (barras no sombreadas) como control negativo.

La figura 5 es un gráfico que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL que se transdujeron con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) en el cocultivo con células 624 diana, células SCC90 o células CaSki sin anticuerpos (barras negras) o en presencia de anticuerpos anti-MHC de clase I (barras grises) o anti-MHC de clase II (barras no sombreadas). Como controles, se transdujeron PBL con TCR de DMF5 y se cocultivaron con células 624 o se transdujeron con TCR anti-MAGE A3 y se cocultivaron con células 526-CIITA sin anticuerpos o en presencia de anticuerpos anti-MHC de clase I o anti-MHC de clase II.

Las figuras 6A-6D son gráficos que muestran la lisis específica (%) de las células diana CaSki (A), SCC90 (B), SCC152 (C) o células 624 (D) cocultivadas con células efectoras transducidas con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) (cuadrados) a diversas razones de efector:diana. Se usaron células no transducidas (círculos) como control negativo.

Las figuras 7A y 7B son gráficos que muestran IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL que se transdujeron con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) (barras sombreadas) o el TCR DCA2E6 anti-HPV 16 E6 (barras no sombreadas) en el cocultivo con células diana sometidas a impulso con diversas concentraciones de péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉ (A) o péptido de HPV 16 E6₂₉₋₃₈ (B).

La figura 8A es un gráfico que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL que se transdujeron con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) (barras negras) o el TCR DCA2E6 (barras grises) en el cocultivo con células 624, células CaSki, células SCC90 o células SCC152 diana. Se usaron células no transducidas (barras no sombreadas) como control negativo.

5 La figura 8B es un gráfico que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL que se transdujeron con un vector retroviral que codifica para el TCR modificado con Cys (β/α) (barras negras) o el TCR DCA2E6 (barras grises) en el cocultivo con células 293-A2 diana sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 sometidas a impulso con péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Ane, células Alb, células Panc1 o células SiHa. Se usaron células no transducidas (barras no sombreadas) como control negativo.

Descripción detallada de la invención

15 Una realización de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que tiene especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16 E7₁₁₋₁₉.

20 HPV 16 es el subtipo de HPV que está más comúnmente asociado con tumor maligno. Sin que se una a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que el HPV 16 provoca cáncer al menos parcialmente a través de las acciones de la oncoproteína E7, que mantiene a las células cancerosas activas en el ciclo de división celular a través de la inactivación de Rb. El HPV 16 E7 se expresa de manera constitutiva en células cancerosas y no se expresa por tejidos humanos normales no infectados. El HPV 16 E7 se expresa en una variedad de cánceres humanos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, conducto anal, anorrecto, vagina, vulva y pene.

25 El TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) tiene especificidad antigénica para un péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉ que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, YMLDLQPET (SEQ ID NO: 2).

30 En una realización de la invención, los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) son capaces de reconocer HPV 16 E7₁₁₋₁₉ de una manera dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. "De manera dependiente de MHC de clase I", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) produce una respuesta inmunitaria tras la unión a HPV 16 E7₁₁₋₁₉ dentro del contexto de la 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 realización preferida de la invención, la molécula de MHC de clase I es una molécula de HLA-A2.

40 Los TCR (incluyendo las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) de la invención proporcionan muchas ventajas, incluyendo cuando se expresan por células usadas para la transferencia celular adoptiva. Sin que se una por ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que debido a que HPV 16 E7 se expresa por células infectadas por HPV 16 de múltiples tipos de cáncer, los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) proporcionan de manera ventajosa la capacidad de destruir células de múltiples tipos de cánceres asociados a HPV 16, y por consiguiente, para tratar o prevenir múltiples tipos de cánceres asociados a HPV 16. De manera adicional, sin que se una a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que debido a que la proteína de HPV 16 E7 se expresa sólo en células cancerosas, los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) seleccionan como diana de manera ventajosa la destrucción de células cancerosas a la vez que reducen al mínimo o eliminan la destrucción de células normales no cancerosas, reduciendo de este modo, por ejemplo, al reducir al mínimo o eliminar, la toxicidad. Además, los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) pueden, de manera ventajosa, tratar o prevenir con éxito cánceres positivos a HPV que no responden a otros tipos de tratamiento, tal como, por ejemplo, quimioterapia sola, cirugía o irradiación. De manera adicional, los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) proporcionan reconocimiento de alta avidéz de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, que puede proporcionar de manera ventajosa la capacidad de reconocer células tumorales no manipuladas (por ejemplo, células tumorales que no se han tratado con interferón (IFN)- γ , transfectadas con un vector que codifica para uno o ambos de HPV 16 E7 y HLA-A2, sometidas a impulso con el péptido E7₁₁₋₁₉, o una combinación de los mismos).

60 La frase "especificidad antigénica", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) puede unirse específicamente a y reconocer de manera inmunológica HPV 16 E7₁₁₋₁₉ con alta avidéz. Por ejemplo, un TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) puede considerarse que tiene "especificidad antigénica" para HPV 16 E7₁₁₋₁₉ si las células T que expresan el TCR (o porción funcional o variante funcional del mismo) 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, 7.000 pg/ml o más, 10.000 pg/ml o más, o 20.000 pg/ml o más) de IFN- γ en cocultivo con células diana HLA-A2⁺ negativas para el antígeno sometidas a impulso con una baja

concentración de péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉ (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). De manera alternativa o adicional, un TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) puede considerarse que tiene "especificidad antigénica" para HPV 16 E7₁₁₋₁₉ si las células T que expresan el TCR (o porción funcional o variante funcional del mismo) secretan al menos dos veces tanto IFN- γ como el nivel de fondo de linfocitos de sangre periférica (PBL) no transducidos de IFN- γ en cocultivo con células diana HLA-A2* negativas para el antígeno sometidas a impulso con una baja concentración de péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉. Las células que expresan los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) también pueden secretar IFN- γ en cocultivo con células diana HLA-A2* negativas para el antígeno sometidas a impulso con altas concentraciones de péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉.

La invención proporciona un TCR que comprende dos polipéptidos (es decir, cadenas de polipéptido), tal 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.

El TCR de la invención comprende dos cadenas de polipéptido, cada una de las cuales comprende una región variable humana que comprende una región determinante de 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 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). El TCR comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3-8.

El TCR de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α humana); SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly (la región variable de una cadena β); ambas SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly; SEQ ID NO: 11 (la región variable de una cadena β humana); o ambas SEQ ID NO: 9 y 11. SEQ ID NO: 10 corresponde a SEQ ID NO: 11 cuando X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Gly. Preferiblemente, el TCR de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de ambas SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala.

Los TCR de la invención pueden comprender adicionalmente una región constante derivada de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón. En una realización de la invención, los TCR comprenden además una región constante humana. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena α humana), SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena β humana), o ambas SEQ ID NO: 14 y 15.

En una realización de la invención, el TCR de la invención puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. A este respecto, 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: 14 (la región constante de una cadena α humana); una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena β humana); una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos tanto de ambas de SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 2 es Ala o Gly (la región variable de una cadena β) y SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena β humana); las secuencias de aminoácidos de todas de SEQ ID NO: 9, 11, 14 y 15; o las secuencias de aminoácidos de todas de SEQ ID NO: 9, 10, 14 y 15.

En una realización de la invención, el TCR de la invención puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. A este respecto, la cadena α del TCR de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. A este respecto, la cadena β del TCR de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. El TCR de la invención, por lo tanto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 12 y 13.

Otra realización de la invención proporciona un TCR quimérico que comprende una región variable humana y una región constante murina, o una variante funcional del TCR, en el que el TCR y la variante funcional comprenden la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, y tienen especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16

E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “murino” o “humano”, cuando se refiere a un TCR o cualquier componente de un TCR descrito en el presente documento (por ejemplo, región determinante de complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena alfa y/o cadena beta), significa 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 origina de o se expresó, en un momento, por una célula T de ratón o una célula T humana, respectivamente.

10 En una realización de la invención, los TCR quiméricos de la invención comprenden una región constante murina. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 19 (la región constante de una cadena β murina), o ambas SEQ ID NO: 17 y 19. En una realización preferida, los TCR de la invención son TCR quiméricos que comprenden tanto una región variable humana como una región constante murina.

15 En una realización de la divulgación, el TCR quimérico de la invención puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. A este respecto, 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: 17 (la región constante de una cadena α murina); una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 19 (la región constante de una cadena β murina); una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly (la región variable de una cadena β) y SEQ ID NO: 19 (la región constante de una cadena β murina); las secuencias de aminoácidos de todas de SEQ ID NO: 9, 11, 17 y 19; o las secuencias de aminoácidos de todas de SEQ ID NO: 9, 10, 17 y 19. En una realización, el TCR quimérico de la invención comprende una cadena beta de longitud completa que comprende SEQ ID NO: 20. A este respecto, el TCR puede comprender todas de SEQ ID NO: 9, 17 y 20.

30 Se incluyen en el alcance de la invención las 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 similitud o identidad de secuencia sustancial o significativa a un TCR, polipéptido o proteína original, con las variantes funcionales que mantienen la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del TCR, polipéptido o proteína descritas en el presente documento (el TCR, polipéptido o proteína original) que mantienen la capacidad de unirse específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2 para el cual el TCR original tiene especificidad antigénica o al cual se une específicamente el polipéptido o proteína original, a un grado similar, al mismo grado o a un mayor grado que el TCR, polipéptido o proteína original. Con referencia al TCR, polipéptido o proteína original, la variante funcional puede ser, por ejemplo, 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 idéntica en la secuencia de aminoácidos al TCR, polipéptido o proteína original.

40 La variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución conservadora de aminoácido. Las sustituciones conservadoras de aminoácido se conocen en la técnica, e incluyen sustituciones de aminoácido en las cuales un aminoácido que tiene determinadas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución conservadora de aminoácido puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral apolar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral apolar (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.

50 De manera alternativa o adicional, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original, con al menos una sustitución no conservadora de aminoácido. En este caso, se prefiere que la sustitución no conservadora de aminoácido no interfiera con ni inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución no conservadora de aminoácido mejora la actividad biológica de la variante funcional, tal que la actividad biológica de la variante funcional se incrementa en comparación al TCR, polipéptido o proteína original.

60 En una realización de la invención, la variante funcional comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los TCR descritos en el presente documento con una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en la región constante de la cadena alfa o beta. Preferiblemente, la variante funcional comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las regiones constantes murinas descritas en el presente documento con una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en la región constante murina. En algunas realizaciones, los TCR (o porciones funcionales de los mismos) que comprenden la(s) secuencia(s) de aminoácidos sustituida(s) proporcionan de manera ventajosa uno o más de reconocimiento aumentado de dianas positivas a HPV 16 E7, expresión aumentada por una célula huésped y actividad antitumoral aumentada en comparación con el TCR original que comprende una

secuencia de aminoácidos no sustituida. En general, las secuencias de aminoácidos sustituidas de las regiones constantes murinas de las cadenas α y β del TCR, SEQ ID NO: 16 y 18, respectivamente, corresponden con todas o con porciones de las secuencias de aminoácidos no sustituidas de región constante murina SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente, con SEQ ID NO: 16 que tiene una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 que tiene una sustitución de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 19. A este respecto, una realización de la invención proporciona una variante funcional de un TCR que comprende las secuencias de aminoácidos de (a) SEQ ID NO: 16 (región constante de cadena alfa), en la que (i) X en la posición 48 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 112 es Ser, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;; (iii) X en la posición 114 es Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; y (iv) X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, o Trp; y (b) SEQ ID NO: 18 (región constante de cadena beta), en la que X en la posición 56 es Ser o Cys. En una realización de la invención, la variante funcional del TCR que comprende SEQ ID NO: 16 no comprende SEQ ID NO: 17 (región constante murina no sustituida de cadena alfa). En una realización de la invención, la variante funcional del TCR que comprende SEQ ID NO: 18 no comprende SEQ ID NO: 19 (región constante murina no sustituida de cadena beta).

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos sustituida incluye sustituciones de cisteína en la región constante de una o ambas de las cadenas α y β para proporcionar un TCR sustituido con cisteína. Las cisteínas opuestas en las cadenas α y β proporcionan un enlace de disulfuro que enlaza las regiones constantes de las cadenas α y β del TCR sustituido entre sí y que no está presente en un TCR que comprende la región constante humana no sustituida o la región constante murina no sustituida. A este respecto, la variante funcional del TCR es un TCR quimérico sustituido con cisteína en el que una o ambas de la Thr48 nativa de SEQ ID NO: 17 y la Ser56 nativa de SEQ ID NO: 19 pueden sustituirse con Cys. Preferiblemente, tanto la Thr48 nativa de SEQ ID NO 17: como la Ser56 nativa de SEQ ID NO: 19 se sustituyen con Cys. En una realización, el TCR quimérico sustituido con cisteína comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que X en la posición 48 es Cys, X en la posición 112 es la Ser nativa, X en la posición 114 es la Met nativa y X en la posición 115 es la Gly nativa, y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en la que X en la posición 56 es Cys. Preferiblemente, el TCR quimérico sustituido con cisteína comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. Los TCR quiméricos sustituidos con cisteína de la invención pueden incluir la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR y/o regiones variables descritas en el presente documento. A este respecto, el TCR quimérico sustituido con cisteína comprende las secuencias de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 3-8 y 23-24; (ii) SEQ ID NO: 9-10 y 23-24; (iii) SEQ ID NO: 9, 11 y 23-24; (iv) SEQ ID NO: 3-8, 16 y 18; (v) SEQ ID NO: 9-10, 16 y 18; o (vi) SEQ ID NO: 9, 11, 16 y 18. En una realización, el TCR quimérico sustituido con Cys comprende una cadena beta de longitud completa que comprende SEQ ID NO: 27. A este respecto, el TCR quimérico sustituido con Cys puede comprender SEQ ID NO: 9 y 24; SEQ ID NO: 27; o todas de SEQ ID NO: 9, 24 y 27.

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos sustituida incluye sustituciones de uno, dos o tres aminoácidos en el dominio transmembrana (TM) de la región constante de una o ambas de las cadenas α y β con un aminoácido hidrófobo para proporcionar un TCR sustituido con aminoácido hidrófobo (también denominado en el presente documento "TCR modificado con LVL"). La(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos hidrófobos en el dominio TM del TCR puede(n) aumentar la hidrofobicidad del dominio TM del TCR en comparación con un TCR que carece de la(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos hidrófobos en el dominio TM. A este respecto, la variante funcional del TCR es un TCR quimérico modificado con LVL en el que una, dos o tres de la Ser112, Met114 y Gly115 nativas de SEQ ID NO: 17 pueden sustituirse independientemente con Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val. Preferiblemente, las tres de la Ser112, Met114 y Gly115 nativas de SEQ ID NO: 17 pueden sustituirse independientemente con Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val. En una realización, el TCR quimérico modificado con LVL comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que X en la posición 48 es la Thr nativa, X en la posición 112 es Ser, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, X en la posición 114 es Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, y X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, en la que el TCR quimérico modificado con LVL que comprende SEQ ID NO: 16 no comprende SEQ ID NO: 17 (región constante murina no sustituida de cadena alfa). Preferiblemente, el TCR quimérico modificado con LVL comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Los TCR quiméricos modificados con LVL de la invención pueden incluir la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR y/o regiones variables descritas en el presente documento. A este respecto, el TCR quimérico modificado con LVL comprende las secuencias de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 3-8 y 19 y 21; (ii) SEQ ID NO: 9-10 y 19 y 21; (iii) SEQ ID NO: 9, 11 y 19 y 21; (iv) SEQ ID NO: 3-8, 16 y 18; (v) SEQ ID NO: 9-10, 16 y 18; o (vi) SEQ ID NO: 9, 11, 16 y 18. En una realización, el TCR quimérico modificado con LVL comprende una cadena alfa de longitud completa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena beta de longitud completa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. A este respecto, el TCR quimérico modificado con LVL puede comprender SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 29, o ambas SEQ ID NO: 20 y 22.

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos sustituida incluye las sustituciones de cisteína en la región constante de una o ambas de las cadenas α y β en combinación con la(s) sustitución/sustituciones de uno, dos o tres aminoácidos en el dominio transmembrana (TM) de la región constante de una o ambas de las cadenas α y β con un aminoácido hidrófobo (también denominado en el presente documento "TCR modificado con LVL sustituido con cisteína"). A este respecto, la variante funcional del TCR es un TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína en el que la Thr48 nativa de SEQ ID NO: 17 se sustituye con Cys; una, dos o tres de las Ser112, Met114 y Gly115 nativas de SEQ ID NO: 17 se sustituyen independientemente con Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val; y la Ser56 nativa de SEQ ID NO: 19 se sustituye con Cys. Preferiblemente, las tres de la Ser112, Met114 y Gly115 nativas de SEQ ID NO: 17 pueden sustituirse independientemente con Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val. En una realización, el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que X en la posición 48 es Cys, X en la posición 112 es Ser, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, X en la posición 114 es Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, y X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp, y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en la que X en la posición 56 es Cys, en la que el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína que comprende SEQ ID NO: 16 no comprende SEQ ID NO: 17 (región constante murina no sustituida de cadena alfa). Preferiblemente, el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína comprende una región constante de cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una región constante de cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. Los TCR quiméricos, modificados con LVL, sustituidos con cisteína de la invención pueden comprender la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR y/o regiones variables descritas en el presente documento. A este respecto, el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína comprende las secuencias de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 3-8 y 23 y 25; (ii) SEQ ID NO: 9-10 y 23 y 25; (iii) SEQ ID NO: 9, 11 y 23 y 25; (iv) SEQ ID NO: 3-8, 16 y 18; (v) SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18; o SEQ ID NO: 9, 11, 16 y 18. En una realización especialmente preferida, el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína comprende una cadena alfa de longitud completa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y una cadena beta de longitud completa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. A este respecto, el TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con Cys puede comprender SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, o ambas SEQ ID NO: 26 como 27.

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, tal que otros componentes del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambien de manera material la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína. A este respecto, el TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína dado a conocer puede consistir, por ejemplo, esencialmente en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 20, 22, 26, 27, 29 y 30. Además, por ejemplo, los TCR (incluyendo variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas dados a conocer pueden consistir esencialmente en la(s) secuencia(s) de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 14-19, 21, 23-25, ambas SEQ ID NO: 9 y 10, ambas SEQ ID NO: 9 y 11, ambas SEQ ID NO: 14 y 15, ambas SEQ ID NO: 16 y 18, ambas SEQ ID NO: 17 y 19, ambas SEQ ID NO: 23 y 24, ambas SEQ ID NO: 19 y 21, o ambas SEQ ID NO: 23 y 25. Además, los TCR (incluyendo variantes funcionales de los mismos) polipéptidos o proteínas dados a conocer pueden consistir 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), SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β), o cualquier combinación de las mismas, por ejemplo, SEQ ID NO: 3-5; 6-8; ó 3-8.

También se proporciona por la presente invención un polipéptido que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCR (o variantes funcionales de los mismos) de la invención descritos en el presente documento. El término "polipéptido" tal como se usa en el presente documento incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena individual de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos.

Con respecto a los polipéptidos de la invención, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR (o variante funcional del mismo) del cual es una parte, con la condición de que la porción funcional se una específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉ y comprenda la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8. El término "porción funcional" cuando se usa con referencia a un TCR (o variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR (o variante funcional del mismo) de la invención, parte o fragmento que mantiene la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo) del cual es una parte (el TCR original o variante funcional original del mismo). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR (o variante funcional del mismo) que mantienen la capacidad para unirse específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉ (por ejemplo, de una manera dependiente de HLA-A2), o para detectar, tratar o prevenir cáncer, a un grado similar, el mismo grado o un mayor grado, como el TCR original (o variante funcional del mismo) y comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa

de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8. Con referencia al TCR original (o variante funcional del mismo), la porción 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 porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo terminal de la porción, 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 porción funcional, por ejemplo, que se unan específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉; y/o que tengan la capacidad de detectar cáncer, tratar o impedir cáncer, etc. De manera más deseable, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR original o variante funcional del mismo.

El polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de todas de SEQ ID NO: 3-8.

En una realización de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención o variante funcional del mismo que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos ambas SEQ ID NO: 9 y 10, o ambas SEQ ID NO: 9 y 11. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala.

El polipéptido de la invención puede comprender además una región constante derivada de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón, descrita en el presente documento o cualquiera de las regiones constantes sustituidas descritas en el presente documento. A este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena α humana), SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena β humana), SEQ ID NO: 16 (región constante de cadena α , sustituida tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención), SEQ ID NO 17 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 18 (región constante de cadena β , sustituida tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención), SEQ ID NO: 19 (la región constante de una cadena β murina), SEQ ID NO: 21 (región constante de una cadena α modificada con LVL), SEQ ID NO: 23 (región constante de una cadena β sustituida con Cys), SEQ ID NO: 24 (región constante de una cadena α sustituida con Cys), SEQ ID NO: 25 (región constante de una cadena α modificada con LVL, sustituida con Cys), ambas SEQ ID NO: 14 y 15, ambas SEQ ID NO: 16 y 18, ambas SEQ ID NO: 17 y 19, ambas SEQ ID NO: 19 y 21, ambas SEQ ID NO: 23 y 24, o ambas SEQ ID NO: 23 y 25. Preferiblemente, el polipéptido comprende ambas SEQ ID NO: 14 y 15, ambas SEQ ID NO: 16 y 18, ambas SEQ ID NO: 17 y 19, ambas SEQ ID NO: 19 y 21, ambas SEQ ID NO: 23 y 24, o ambas SEQ ID NO: 23 y 25. En una realización, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una o ambas de SEQ ID NO: 9 y 11 se aísla o purifica.

En una realización de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. A este respecto, el polipéptido puede comprender todas de SEQ ID NO: 3-8 y 14-15, todas de SEQ ID NO: 3-8 y 16 y 18, todas de SEQ ID NO: 3-8 y 17 y 19, todas de SEQ ID NO: 3-8 y 19 y 21, todas de SEQ ID NO: 3-8 y 23 y 24, todas de SEQ ID NO: 3-8 y 23 y 25, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 14-15, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 16 y 18, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 17 y 19, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 19 y 21, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 23 y 24, todas de SEQ ID NO: 9-10 y 23 y 25, todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 14-15, todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 16 y 18, todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 17 y 19, todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 19 y 21, todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 23 y 24, o todas de SEQ ID NO: 9, 11 y 23 y 25. Las SEQ ID NO: 16 y 18 pueden sustituirse tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. En una realización, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una o ambas de (i) SEQ ID NO: 9 y 14 y (ii) SEQ ID NO: 11 y 15 se aísla o purifica.

En una realización de la divulgación, el polipéptido dado a conocer 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. A este respecto, el polipéptido dado a conocer puede comprender una secuencia de aminoácidos de (i) una cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 20, 22, 26, 27, 29, 30; (ii) SEQ ID NO: 9, 24 y 27; (iii) SEQ ID NO: 9, 17 y 20; o (iv) SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18. Las SEQ ID NO: 16 y 18 pueden sustituirse tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la divulgación.

De manera alternativa, el polipéptido de la invención puede comprender cadenas α y β de los TCR 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 SEQ ID NO: 12 y 13; ambas SEQ ID NO: 20 y 22; ambas SEQ ID NO: 26 y 27; todas de SEQ ID NO: 9, 24 y 27; todas de SEQ ID NO: 9, 17 y 20; o todas de SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas SEQ ID NO: 12 y 13; ambas SEQ ID NO: 20 y 22; ambas SEQ ID NO: 26 y 27; todas de SEQ ID NO: 9, 24 y 27; todas de SEQ ID NO: 9, 17 y 20; o todas de SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18.

9, 17 y 20; o todas de SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18. Las SEQ ID NO: 16 y 18 pueden sustituirse tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. En una realización, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una o ambas de SEQ ID NO: 12 y 13 se aísla o purifica.

5 La invención 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 que comprende (a) ambas de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Gly o (b) ambas de SEQ ID NO: 12 y 13 se aísla o purifica.

10 En una realización, la proteína de la invención puede comprender 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. De manera alternativa o adicional, la proteína de la invención puede comprender 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, en la que (i) X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly, y (ii) la proteína que comprende SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Gly, se aísla o purifica. La proteína puede comprender, por ejemplo, una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 22, (iii) SEQ ID NO: 26, (iv) SEQ ID NO: 9 y 16, (v) SEQ ID NO: 9 y 17, o (vi) SEQ ID NO: 9 y 24, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 10 y 18, o (ii) una cualquiera de SEQ ID NO: 13, 20 y 27, en la que la proteína que comprende SEQ ID NO: 12 y 13 se aísla o purifica, y las SEQ ID NO: 16 y 18 se sustituyen tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. En este caso, la proteína de la invención puede ser un TCR. De manera alternativa, si, por ejemplo, la proteína comprende una cadena de polipéptido individual que comprende ambas SEQ ID NO: 12 y 13, ambas SEQ ID NO: 20 y 22, SEQ ID NO: 26 y 27, todas de SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18, todas de SEQ ID NO: 9, 17 y 20, todas de SEQ ID NO: 9, 24 y 27, o si la primera y/o segunda cadena(s) de polipéptido de la proteína comprende(n) además otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifica para una inmunoglobulina o una porción de la misma, entonces la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. A este respecto, 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 un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como un 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 proteínica, o una porción 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. Los métodos adecuados para producir proteínas de fusión se conocen en la técnica, 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 (y porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos y proteínas de la invención pueden expresarse como una proteína individual que comprende un péptido ligador que enlaza la cadena α y la cadena β . A este respecto, los TCR (y variantes funcionales y porciones funcionales de los mismos), polipéptidos y proteínas de la invención que comprenden ambas SEQ ID NO: 12 y 13, ambas SEQ ID NO: 20 y 22, SEQ ID NO: 26 y 27, todas de SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18, todas de SEQ ID NO: 9, 17 y 20, todas de SEQ ID NO: 9, 24 y 27 pueden comprender además un péptido ligador. El péptido ligador puede facilitar de manera ventajosa la expresión de un TCR recombinante (incluyendo porciones 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 SEQ ID NO: 28. En una realización de la invención, la proteína que comprende una cadena alfa, una cadena beta y un ligador puede comprender SEQ ID NO: 29 (TCR quimérico modificado con LVL) o SEQ ID NO: 30 (TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con Cys). En 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 genéticamente) que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una cadena de polipéptido de un anticuerpo, o una porción del mismo. El polipéptido de un anticuerpo, o porción 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 individual (scFv), o un fragmento Fc, Fab o F(ab₂') de un anticuerpo, etc. La cadena de polipéptido de un anticuerpo, o porción del mismo, puede existir como un polipéptido separado del anticuerpo recombinante. De manera alternativa, la cadena de polipéptido de un anticuerpo, o porción del mismo, puede existir como un polipéptido que se expresa en marco (en tándem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo, o porción 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.

5 Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención (incluyendo variantes funcionales de los mismos) pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, con la condición de que los TCR, polipéptidos o proteínas (o variantes funcionales de los mismos) mantengan su actividad funcional, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉; detectar cáncer, infección por HPV 16, o tumor maligno previo positivo a HPV en un mamífero; o tratar o prevenir cáncer, infección por HPV 16, o tumor maligno previo positivo a HPV en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede estar en el intervalo de desde
10 aproximadamente 50 hasta aproximadamente 5000 aminoácidos de longitud, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud. A este respecto, los polipéptidos de la invención también incluyen oligopéptidos.

15 Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención (incluyendo variantes funcionales de los mismos) de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se presentan 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-hidroxi-prolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxisisina, ornitina, ácido α -aminociclopentanocarboxílico, ácido α -aminociclohexancarboxílico, ácido α -aminocicloheptancarboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

25 Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención (incluyendo variantes funcionales de los mismos) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, forforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse mediante, por ejemplo, un puente de disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

30 El TCR, polipéptido y/o proteína de la invención (incluyendo variantes funcionales del mismo) puede obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen 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 la patente estadounidense n.º
35 5.449.752. Además, los polipéptidos y proteínas pueden producirse 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, 4^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. De manera adicional, algunos de los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención
40 (incluyendo variantes funcionales de los mismos) pueden aislarse y/o purificarse de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación se conocen bien en la técnica. De manera alternativa, 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 (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los TCR de la invención (incluyendo variantes funcionales de los
45 mismos), polipéptidos y proteínas pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

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

55 Una realización de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en el presente documento. Por "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y significa en general un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo
60 aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleótido natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforoamidato o un enlace de fosforotioato, en lugar del fosfotéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En una realización, el ácido nucleico comprende ADN complementario (ADNc). En general, se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser
65 adecuado en algunos casos, tal como se analiza en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o

más inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones.

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 al unir segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácidos nucleicos que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de aquellas descritas en (i) anterior. Para los propósitos del presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

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 presentan de manera natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado en 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-yodouracilo, 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 N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. De manera alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención pueden comprarse de empresas, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas o variantes funcionales de los mismos descritos en el presente documento. En una realización de la invención, la secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en cualquiera de ambas SEQ ID NO: 31 y 32, ambas SEQ ID NO: 33 y 34, o ambas SEQ ID NO: 35 y 36.

En una realización de la invención, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos no natural. Una secuencia de nucleótidos puede considerarse como que es "no natural" si la secuencia de nucleótidos no se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede optimizarse por codón. Sin que se una a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización por codón de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficacia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización por codón 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 de este modo la eficacia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que pueden interferir con la traducción, aumentando de este modo la eficacia de traducción. En una realización de la invención, la secuencia de nucleótidos optimizada por codón puede comprender, consistir o consistir esencialmente en ambas de SEQ ID NO: 33 y 34 o ambas de SEQ ID NO: 35 y 36.

La invención también 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 a 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 a una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían a un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta o una que sólo contenga pocos apareamientos erróneos dispersos de una secuencia aleatoria que puede tener unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que correspondan a la secuencia de nucleótidos. Estas pequeñas regiones de complementariedad se fusionan más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace más fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirán, por ejemplo, condiciones de poca sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por aproximadamente NaCl 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Estas condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si lo hay, apareamiento erróneo entre la secuencia de nucleótidos y el molde o la cadena diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). En general, se aprecia que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es 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% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

5 Los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. A este respecto, 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 el péptido ligador. Por ejemplo, en una realización, el vector
10 de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos optimizada por codón que comprende SEQ ID NO: 39 (que codifica para las cadenas α y β quiméricas SEQ ID NO: 20 y 22 con un ligador colocado entre ellas, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta está colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa).

15 Para los propósitos del presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por 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 tener al ARNm, proteína, polipéptido o péptido expresado dentro de la célula. Los vectores de la
20 invención no se presentan de manera natural como una totalidad. No obstante, las partes de los vectores pueden presentarse 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 monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinante pueden comprender enlaces internucleótido que se
25 presentan de manera natural o que no se presentan de manera natural, o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los enlaces internucleótido o nucleótidos que no se presentan de manera natural o alterados no impedirán la transcripción o replicación del vector.

El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante
30 adecuado y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula huésped adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión, o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, La Jolla, 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
35 bacteriófago, tales como λ GPT10, λ GPT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de origen vegetal incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de origen animal 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 MSGV1.

40 En una realización preferida, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena alfa y una cadena beta de cualquiera de los TCR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) descritos en el presente documento, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta está colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa. A este
45 respecto, la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa puede estar colocada 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta. Sin que se una por ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que una secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena beta que está colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa puede proporcionar cualquiera de uno o más de reconocimiento aumentado de las dianas positivas a HPV 16 E7, expresión aumentada por una célula huésped y actividad
50 antitumoral aumentada en comparación con una secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena beta que está colocada 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa. En una realización menos preferida, la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta está colocada 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa. A este respecto, la secuencia de nucleótidos que codifica para la
55 cadena alfa puede estar colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta. En una realización, un vector MSGV1 que comprende una secuencia de nucleótidos optimizada por codón que codifica para un TCR quimérico modificado con LVL que comprende las SEQ ID NO: 20 y 22 de la invención, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta está colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que
60 codifica para la cadena alfa, comprende SEQ ID NO: 37. En otra realización, un vector MSGV1 que comprende una secuencia de nucleótidos optimizada por codón que codifica para un TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con Cys que comprende las SEQ ID NO: 26 y 27 de la invención, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta está colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa, comprende SEQ ID NO: 38.

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden prepararse usando técnicas normales de ADN
65 recombinante descritas en, por ejemplo, Green y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Los constructos de los vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para

contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2_m, λ, VS40, papilomavirus bovino y similares.

5 De manera deseable, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tal como codones de inicio y terminación de transcripción y traducción que son específicos al tipo de célula huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en la que va a introducirse el vector, tal como sea apropiado y tomando en consideración si el vector es a base de ADN o ARN.

10 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 biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en una célula huésped auxotrófica para proporcionar fototrofia, 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 hidromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

15 El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo operativamente enlazado 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 o que se hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo variantes funcionales del mismo). La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos de desarrollo, está dentro de la habilidad de un experto en la técnica. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la habilidad de un experto en la técnica. 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 VRS y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

20 Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse ya sea para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinante pueden producirse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible. De manera adicional, los vectores de expresión recombinante pueden producirse para incluir un gen suicida.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "gen suicida" se refiere a un gen que provoca que la célula que expresa al gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, en la célula en la que se expresa el gen, y provoca que la célula muera cuando la célula se pone en contacto con o se expone al agente. Los genes suicidas se conocen en la técnica (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, RU, Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, gen de timidina-cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina-daminasa, purina-nucleósido-fosforilasa y nitro-reductasa.

40 Otra realización de la invención proporciona adicionalmente una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante 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 pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, planta, animal o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacteria o protozoo. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. Una célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células huésped adecuadas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5α de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los propósitos de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5α. Para los propósitos de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula de mamífero. De manera más preferible, la célula huésped es una célula humana. Mientras que la célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula, y puede originarse de cualquier tipo de tejido, y puede ser de cualquier fase de desarrollo, la célula huésped es preferiblemente un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). De manera más preferible, la célula huésped es una célula T.

60 Para los propósitos del 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 de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T puede obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglio linfático, el timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. Preferiblemente, la célula T es una célula T humana. De manera más preferible, la célula T es una célula T aislada 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 a CD4⁺/CD8⁺, células T auxiliares CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, células T CD4⁺, células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central y células T de memoria efectora), células T vírgenes, y similares.

También se proporciona por la invención una población de células que comprende al menos una célula huésped 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 diferente de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, o una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. De manera alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una célula huésped individual que comprenden un vector de expresión recombinante, tal que todas las células de la población comprendan 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, el número de células en la población puede expandirse rápidamente. La expansión de los números de células T puede lograrse por cualquiera de varios métodos tal como se conoce en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 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 adicionalmente un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo que se forma 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 presenta de manera natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, gallina, hámster, ser humano, etc. De manera alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado genéticamente, 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 para la porción funcional del TCR de la invención (o variante funcional del mismo). De manera deseable, el anticuerpo es específico para la porción funcional del TCR de la invención (o variantes funcionales del mismo), tal que hay una mínima reacción cruzada con otros péptidos o proteínas.

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

Los métodos adecuados de elaboración de anticuerpos se conocen en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma convencionales en, por ejemplo, Köhler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow y 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)). De manera alternativa, en la técnica se conocen otros métodos, tal como métodos de EBV-hibridoma (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)). De manera adicional, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen en, por ejemplo, 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.

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

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

En la técnica se conocen bien los métodos para generar anticuerpos humanizados y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente, las patentes estadounidenses 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea n.º 0239400 B1 y la patente del Reino Unido n.º 2188638. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse usando la tecnología de resuperficialización de anticuerpos descrita en, por ejemplo, la patente estadounidense 5.639.641 y Pedersen *et al.*, J. Mol. Biol., 235, 959973 (1994).

La invención también proporciona porciones de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. La porción de unión a antígeno puede ser cualquier porción que tenga 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 individual (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo enlazada a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo mediante 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 con disulfuro (dsFv) por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter *et al.*, Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)). Los fragmentos de anticuerpo de la invención, no obstante, no se limitan a estos tipos de fragmentos de anticuerpo a modo de ejemplo.

Además, el anticuerpo, o porción de unión 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 elementales (por ejemplo, partículas de oro).

Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluyendo variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluyendo porciones 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 ambiente natural. El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, significa que se ha aumentado en pureza, en el que "pureza" es un término relativo y no se considera necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50%, puede ser mayor del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, o puede ser del 100%.

Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluyendo variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluyendo porciones de unión a antígeno de los mismos) de la invención, todos ellos denominados colectivamente "materiales de TCR de la invención" a continuación en el presente documento, pueden formularse en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, porciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluyendo porciones 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 (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). De manera alternativa, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s), o fármaco(s), tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de aquellos usados convencionalmente para el material de TCR de la invención particular en consideración. Tales portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y están fácilmente disponibles al público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales ni toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador se determinará 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 intraperitoneal. 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.

Preferiblemente, el material de TCR de la invención se administra por 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 (o variante

funcional del mismo), 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 electrolitos NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL),
5 aproximadamente el 5% de dextrosa en agua o lactato de Ringer. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina sérica humana.

Para los propósitos de la invención, 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
10 efectuar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal a lo largo de un marco 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 impedir cáncer en un periodo de desde aproximadamente 2 horas o más tiempo, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de administración. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo puede ser aún más largo. La dosis se determinará por la eficacia del material de TCR de la
15 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.

En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para los propósitos de la invención, puede usarse un ensayo, que comprende comparar el grado al cual las células diana se lisan o se secreta
20 IFN- γ por las células T que expresan el TCR de la invención (o variante funcional o porción funcional del mismo), polipéptido o proteína en la administración de una dosis dada de estas células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos de los cuales a cada uno se le da una dosis diferente de las células T, para determinar una dosis de inicio que va a administrarse a un mamífero. El grado al cual se lisan las células diana o se secreta IFN- γ en la administración de una determinada dosis puede evaluarse mediante métodos conocidos en la técnica.

La dosis del material de TCR de la invención también se determinará 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. Típicamente, el médico tratante decidirá la dosificación del material de TCR de la invención con
25 la que tratar a cada paciente individual, tomando en consideración una variedad de factores, tal como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de TCR de la invención que va a administrarse, vía de administración y la gravedad del estado que va a tratarse. 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, desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{12} células o más. En determinadas realizaciones, pueden administrarse menos de 1×10^6 células.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR de la invención pueden modificarse de cualquier número de maneras, tal que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de TCR de la invención se aumenta a través de la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR de la invención pueden conjugarse ya sea directa o indirectamente a través de un puente a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar
30 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 la 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 y se une específicamente a un receptor de superficie celular, tal que el resto de direccionamiento dirige el suministro de los materiales de TCR de la invención a una población de células, en 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 una a los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR), etc.). El término "puente", tal como se usa
45 en el presente documento, se refiere a cualquier agente o molécula que enlace los materiales de TCR de la invención al resto de direccionamiento. Un experto en la técnica reconoce que los sitios en los materiales de TCR de la invención, que no son necesarios para la función de los materiales de TCR de la invención, son sitios ideales para unir un puente y/o un resto de direccionamiento, siempre que el puente y/o resto de direccionamiento, una vez unidos a los materiales de TCR de la invención, no interfiera(n) con la función de los materiales de TCR de la invención, es decir, la capacidad de unirse a HPV 16 E7₁₁₋₁₉; o detectar, tratar o impedir cáncer, infección por HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.
50

Se contempla que las composiciones farmacéuticas, TCR (incluyendo variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped o poblaciones de
60 células de la invención, pueden usarse en los métodos de tratamiento o prevención de cáncer, infección por HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV. Sin que se una a ninguna teoría particular, se cree que los TCR de la invención (y variantes funcionales de los mismos) se unen específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉, tal que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionado y variantes funcionales de los mismos), cuando se exprese por una célula, es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra una célula diana que expresa HPV 16 E7. A este respecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de un estado en un mamífero que
65 comprende administrar al mamífero cualquiera de las composiciones farmacéuticas, TCR (y variantes funcionales de

los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en el presente documento, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para cualquiera de los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas descritos en el presente documento, o cualquier célula huésped o población de células que comprendan un vector recombinante que codifique para cualquiera de los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el estado en el mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.

Los términos “tratar” y “prevenir”, así como palabras derivadas de los mismos, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente tratamiento o prevención al 100% o completo. Más bien, hay grados variables de tratamiento o prevención de los que un experto en la técnica reconoce como que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos dados a conocer pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de un estado en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método dado a conocer pueden incluir tratamiento o prevención de uno o más estados o síntomas del estado, por ejemplo, cáncer, que va a tratarse o prevenirse. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención pueden incluir fomentar la regresión de un tumor. Además, para los propósitos del presente documento, “prevención” puede abarcar el retraso de la aparición del estado, o un síntoma o estado del mismo.

Además, en el presente documento 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 (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células, anticuerpos o porciones de un antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas de la invención descritos en el presente documento, formando de este modo 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 HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.

Con respecto al método *in vitro* de la invención de detección de un estado en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que comprenda células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de células completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplásmica, una fracción de proteína completa o una fracción de ácido nucleico.

Para los propósitos del método de detección de la invención, la puesta en contacto es *in vitro*.

Además, la detección del complejo puede presentarse a través de cualquiera de varias maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células o anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención descritos en el presente documento, pueden etiquetarse 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 elementales (por ejemplo, partículas de oro).

Para los propósitos de los métodos dados a conocer, en los que se administren células huésped o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas al mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas al mamífero.

Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer del ano, conducto 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 oral, 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 ovario, cáncer del pene, cáncer de páncreas, cáncer del peritoneo, epiplón 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 de testículo, cáncer de tiroides, cáncer del útero, cáncer de uretra y cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferido es cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, conducto anal, anorrecto, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferido es cáncer positivo a HPV 16. Si bien los cánceres más comúnmente asociados con infección por HPV 16 incluyen cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, conducto anal, anorrecto, vagina, vulva y pene, los métodos de la invención pueden usarse para tratar cualquier cáncer positivo a HPV 16, incluyendo aquellos que se presentan en otras áreas anatómicas.

El mamífero referido en los métodos de la invención 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). Es más preferido 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 el mamífero sea del orden de primates, ceboideos o simoides (monos) o del orden de antropoides (humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deben considerarse que limitan su alcance de ninguna manera.

10 Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra el aislamiento de un TCR anti-HPV 16 E7 humano de neoplasia.

15 Las muestras de linfocitos de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) II/III positiva a HPV 16 se obtuvieron de catorce pacientes. Los pacientes habían recibido previamente diversas vacunas que seleccionaban como diana a HPV 16 E7. Los números de los linfocitos infiltrantes en el cuello uterino (CIL) se expandieron usando el protocolo de expansión rápida (REP) tal como se describió previamente (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 "alimentadoras" mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (40 Gy) en medio completo (CM) con 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 6000 UI/ml de IL-2. Los números expandidos de CIL se examinaron para determinar la reactividad de HPV 16 E7 al medir la secreción de interferón (IFN)- γ después del cocultivo con células dendríticas (DC) autólogas sometidas a impulso con péptido gp100, una mezcla de péptidos E6 de 15 meros que se superponen por 11 residuos de aminoácido y que abarcan la longitud completa de HPV 16 E6, una mezcla de péptidos E7 de 15 meros que se superponen por 11 residuos de aminoácido y que abarcan la longitud completa de HPV 16 E7, u
20 OKT3. Los CIL CD8⁺ de un paciente (5048) se identificaron como que tenían reactividad a HPV 16 E7. También se encontró que el paciente 5048 expresaba HLA-A*02:01.

Un tetramero de HLA-A*02:01/E7₁₁₋₁₉ se usó para determinar la presencia de células T del paciente 5048 que seleccionaba como diana el epítipo HPV 16 E7₁₁₋₁₉. Las células que se unen al tetramero se aislaron usando separación por cuentas magnéticas usando anticuerpos anti-PE y se realizó la clonación por dilución limitante. Los clones de células T se examinaron para la unión al tetramero y se identificó un clon de alta unión.

Las regiones variables de las cadenas alfa y beta del TCR del clon que se unieron al tetramero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ se aislaron y secuenciaron usando amplificación 5' rápida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extremos de ADNc (RACE). Una secuencia de nucleótidos que comprende el ADNc que codifica para la región variable de una cadena α humana de tipo natural que comprende SEQ ID NO: 9 se obtuvo de TRAV1-2*01/TRAJ7*01. Una secuencia de nucleótidos que comprende ADNc que codifica para la región variable de una cadena β humana de tipo natural que comprende SEQ ID NO: 11 se obtuvo de TRBV5-6*01/TRBJ2-1/TRBD2.

40 Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que las células T de sangre periférica transducidas para expresar un TCR anti-HPV 16 E7 quimérico que comprende una región variable humana y una región constante de ratón mostraron unión independiente a CD8 al tetramero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ y reconocieron líneas tumorales HLA-A2⁺ HPV-16⁺.

Un vector de expresión recombinante MSGV1 que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para un TCR anti-HPV 16 E7 quimérico que comprende una región variable humana derivada del TCR humano de tipo natural del ejemplo 1 y una región constante de ratón se preparó de la siguiente manera. Las secuencias de nucleótidos en el vector de expresión recombinante codificaron para la región variable de la cadena α y la región variable de la cadena β del TCR del ejemplo 1, con la excepción que una alanina se sustituyó por la glicina nativa en la segunda posición de la región variable de la cadena β (la secuencia guía) a fin de proporcionar un sitio de restricción NcoI y una secuencia Kozak en el vector de expresión recombinante. Las secuencias de nucleótidos que codifican para una región constante murina de las cadenas α y β (SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente) se insertaron en el vector en lugar de las respectivas regiones constantes humanas para proporcionar una secuencia de nucleótidos que codifica para un TCR quimérico. Una secuencia de nucleótidos optimizada por codón que codifica para un péptido 2A de picornavirus (SEQ ID NO: 28) se colocó entre las cadenas α y β . La secuencia de nucleótidos que codifica para las cadenas α y β quiméricas y el ligador se optimizaron por codón para la expresión en tejidos humanos.

Se transdujeron células de sangre periférica con retrovirus del vector de expresión recombinante MSGV1 que codifica para el TCR quimérico o un vector que codifica para un TCR anti-HPV 16 E7 completamente murino. Se usaron células no transducidas como control negativo. Las células transducidas se marcaron con anticuerpos anti-CD8 y anti-TRBC (región constante de ratón) y se sometieron a prueba para determinar la unión al tetramero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ mediante citometría de flujo. Las células no transducidas (tanto CD8⁺ como CD8⁻) y células transducidas para expresar un TCR anti-HPV 16 E7 de ratón de control que se identificó en experimentos anteriores (tanto CD8⁺ como CD⁻) no se unen al tetramero. Las células tanto CD8⁺ como CD⁻ transducidas con el TCR de HPV-16 E7

quimérico se unieron al tetrámero. Por consiguiente, los PBL transducidos con el TCR quimérico se unieron al tetrámero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ de una manera independiente a CD8. También se observó que aproximadamente el 50% de las células T transducidas que expresan la cadena β del TCR quimérico no se unen al tetrámero.

5 En un experimento separado, se transdujeron linfocitos de sangre periférica (PBL) con el vector de expresión recombinante MSGV1 que codifica para el TCR quimérico con una eficacia de transducción de aproximadamente el 50%. Se midió la unión al tetrámero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉ mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y se encontró que el 25% de las células se unen al tetrámero en el día 8 después de la estimulación. Las células transducidas se cocultivaron con células 293-A2 diana sometidas a impulso con el péptido de HPV 16 E6₂₉₋₃₈ (control), células 293-A2 sometidas a impulso con el péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Alb, células Panc1 o células SiHa 10 días después de la estimulación. Se usaron células no transducidas como control. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, los PBL transducidos con el vector de expresión recombinante MSGV1 que codifica para el TCR quimérico reconocieron específicamente líneas de células tumorales positivas a HPV 16 E7 y otras dianas HLA-A2⁺HPV16 E7⁺ de una manera restringida a HLA-A2. Los resultados obtenidos con las células de un segundo donante fueron similares.

Ejemplo 3

20 Este ejemplo demuestra un método para producir un TCR anti-HPV 16 E7 quimérico que comprende una región variable humana y una región constante de ratón, en el que tres residuos de aminoácidos nativos en la región transmembrana (TM) de la región constante de la cadena α del TCR se sustituyen cada uno con un residuo de aminoácido hidrófobo.

25 Una secuencia de nucleótidos que codifica para un TCR quimérico que comprende una región variable humana y una región constante de ratón, en la que tres residuos de aminoácidos nativos en la región transmembrana (TM) de la región constante de la cadena α del TCR se sustituyen cada uno con un residuo de aminoácido hidrófobo, se preparó de la siguiente manera. Las secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas α y β del TCR quimérico del ejemplo 2 se clonaron en una secuencia de nucleótidos individual con la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena β colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa y una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido 2A de picornavirus (SEQ ID NO: 28) colocado entre las cadenas α y β . Con referencia a la región constante de ratón de cadena α de tipo natural, SEQ ID NO: 17, tres residuos de aminoácidos nativos en la región TM de la cadena α (específicamente, la Ser, Met y Gly en las posiciones 112, 114 y 115, respectivamente, se sustituyeron con Leu, Ile y Val, respectivamente). La secuencia de nucleótidos combinada se optimizó por codón para la expresión en tejidos humanos para proporcionar un inserto de vector (SEQ ID NO: 39). El inserto de vector se clonó en un vector de expresión MSGV1 dando como resultado SEQ ID NO: 37. El TCR codificado por el vector comprendía una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 22 y una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 20 ("TCR modificado con LVL" o "LVL TCR").

Ejemplo 4

45 Este ejemplo demuestra un método de elaboración de TCR anti-HPV 16 E7 quiméricos que comprenden una región variable humana y una región constante de ratón, en el que un residuo de aminoácido nativo en las cadenas β y α se sustituye cada uno con un residuo de serina.

50 El TCR del ejemplo 2 se modificó para incluir una sustitución de Cys en la región constante de cada una de las cadenas α y β de la siguiente manera. La secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la cadena α del TCR del ejemplo 2 (aminoácidos de SEQ ID NO: 17) se modificó para sustituir la Thr nativa en la posición 48 con Cys. La secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la cadena β del TCR del ejemplo 2 (SEQ ID NO: 19) se modificó para sustituir la Ser nativa en la posición 56 con Cys. Las secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas α y β se clonaron en una secuencia de nucleótidos individual con la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena β colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena α y una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido 2A de picornavirus (SEQ ID NO: 28) colocado entre las cadenas α y β . La secuencia de nucleótidos combinada se optimizó por codón para la expresión en tejidos humanos para proporcionar un inserto de vector. El inserto de vector se clonó en un vector de expresión MSGV1. El TCR codificado por el vector comprendía una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 9 y 24 y una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 27 ("TCR modificado con Cys" o "Cys TCR").

60 El TCR del ejemplo 3 (TCR modificado con LVL) se modificó adicionalmente para incluir una sustitución Cys en la región constante de cada una de las cadenas α y β de la siguiente manera. La secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la cadena α del TCR modificado con LVL del ejemplo 3 (aminoácidos de SEQ ID NO: 21)

se modificó para sustituir la Thr nativa en la posición 48 con Cys. La secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la cadena β del TCR modificado con LVL del ejemplo 3 (SEQ ID NO: 19) se modificó para sustituir la Ser nativa en la posición 56 con Cys. Las secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas α y β se clonaron en una secuencia de nucleótidos individual con la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena β colocada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena α y una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido 2A de picornavirus (SEQ ID NO: 28) colocado entre las cadenas α y β . La secuencia de nucleótidos combinada se optimizó por codón para la expresión en tejidos humanos para proporcionar un inserto de vector (SEQ ID NO: 40). El inserto de vector se clonó en un vector de expresión MSGV1 dando como resultado SEQ ID NO: 38. El TCR codificado por el vector comprendía una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 26 y una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 27 ("TCR modificado con LVL-Cys" o "LVL-Cys TCR").

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que la modificación del vector de expresión recombinante que codifica para el TCR anti-HPV 16 E7 quimérico del ejemplo 2 mejoró la unión al tetrámero HPV 16 E7₁₁₋₁₉ y mejoró el reconocimiento de las líneas de células tumorales HPV 16⁺.

Los PBL de dos donantes se transdujeron con uno de los vectores de expresión recombinante expuestos en la tabla 1.

Tabla 1

TCR	aminoácidos de SEQ ID NO de TCR	Posición de la cadena α y β en el vector
TCR anti-HPV 16 E7 quimérico (ejemplo 2)	9, 10, 17 y 19, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala	la cadena alfa se coloca 5' de la cadena beta (" α/β ")
TCR modificado con Cys	9, 24, 27	α/β
TCR modificado con LVL	20, 22	α/β
TCR modificado con LVL-Cys	26, 27	α/β
TCR anti-HPV 16 E7 quimérico (ejemplo 2)	9, 10, 17 y 19, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala	la cadena beta se coloca 5' de la cadena alfa (" β/α ")
TCR modificado con Cys	9, 24, 27	β/α
TCR modificado con LVL	20, 22	β/α
TCR modificado con LVL-Cys	26, 27	β/α

Los PBL transducidos de dos donantes normales se sometieron a prueba para determinar la unión al tetrámero HPV 16 E7₁₁₋₁₉ mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-tetrámero HPV 16 E7₁₁₋₁₉ y anti-TRBC de ratón (m) en el día 8 después de la estimulación. Se usaron células no transducidas como control negativo. Los resultados se muestran en las figuras 2A-2R. El porcentaje de células teñidas detectadas en cada cuadrante se proporciona encima de cada gráfico. Tal como se muestra en las figuras 2A-2R, las células transducidas con un vector de expresión recombinante en el que la cadena β se colocó 5' de la cadena α , demostró unión mejorada al tetrámero en comparación con células transducidas con un vector de expresión recombinante en el que la cadena α se colocó 5' de la cadena β . Además, tal como se muestra en las figuras 2A-2R, las células transducidas con un TCR modificado con Cys, un TCR modificado con LVL o un TCR modificado con LVL-Cys demostraron cada una unión mejorada al tetrámero en comparación con células transducidas con el TCR del ejemplo 2.

En un experimento separado, las células transducidas se cocultivaron con células 624, células CaSki, células SCC90 o células SCC152 11 días después de la estimulación, y se midió la secreción de IFN- γ . Se usaron células no transducidas como control negativo. Los resultados se muestran en las figuras 3A y 3B. Tal como se muestra en las figuras 3A y 3B, las células transducidas con un TCR modificado con Cys, un TCR modificado con LVL o un TCR modificado con LVL-Cys demostraron cada una reconocimiento mejorado en líneas tumorales HPV 16⁺ en comparación con células transducidas con el TCR del ejemplo 2. Además, tal como se muestra en las figuras 3A-3B, las células transducidas con un vector de expresión recombinante en las que la cadena β se colocó 5' de la cadena α demostraron, en general, reconocimiento mejorado de las líneas tumorales HPV 16⁺ en comparación con células transducidas con un vector de expresión recombinante en el que la cadena α se colocó 5' de la cadena β .

Las células transducidas con un vector de expresión recombinante en las que la cadena β se colocó 5' de la cadena α también demostraron expresión mejorada en comparación con células transducidas con un vector de expresión recombinante en las que la cadena α se colocó 5' de la cadena β , tal como se mide mediante citometría de flujo.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que las células T transducidas con un vector de expresión recombinante que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) demostraron unión independiente a CD8 del tetrámero HPV-16 E7₁₁₋₁₉.

5 Se transdujeron células de sangre periférica con el vector de expresión recombinante MSGV1 que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) del ejemplo 4. Las células transducidas se marcaron con anticuerpos anti-CD8, anti-TRBC (región constante de ratón) y tetrámero HLA-A2/E7₁₁₋₁₉, y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células CD8⁺ transducidas y las células CD8⁻ transducidas de ambos donantes se unieron ambas al tetrámero, lo que demostró unión independiente a CD8.

10

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL (β/α) reconocen específicamente el péptido HPV 16 E7₁₁₋₁₉ y líneas de células tumorales HPV 16⁺.

15

Se transdujeron PBL con un vector de expresión recombinante que codifica para TCR modificado con LVL (β/α) (SEQ ID NO: 37) del ejemplo 3. Se realizó la expansión rápida de los números de células usando el protocolo de expansión rápida (REP) tal como se describió previamente (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 "alimentadoras" mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (40 Gy) en medio completo (CM) con 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 6000 UI/ml de IL-2. Las células transducidas expandidas se cocultivaron con células 293-A2 diana sometidas a impulso con el péptido de HPV 16 E7₂₉₋₃₈ (control), células 293-A2 sometidas a impulso con el péptido de HPV 16 E7₁₁₋₁₉, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para HPV 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Alb, células Panc1, células Ane o células SiHa. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, los PBL transducidos con un vector de expresión recombinante que codifica para el TCR modificado con LVL (β/α) reconocieron específicamente líneas de células tumorales positivas a HPV 16 E7 y otras dianas HLA-A2⁺HPV16 E7⁺ de una manera restringida a HLA-A2. Los resultados obtenidos con las células de un segundo donante fueron similares.

20

25

30

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra que las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) reconocen específicamente líneas de células tumorales HPV 16⁺ y que este reconocimiento se bloquea por anticuerpos anti-MHC de clase I. Este ejemplo también demuestra que estas células T transducidas destruyen específicamente líneas de células tumorales HPV 16⁺ HLA-A2⁺.

35

40

45

Se transdujeron PBL con un vector de expresión recombinante que codifica para TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38). Se realizó la expansión rápida de los números de células usando REP tal como se describe en el ejemplo 7. Las células transducidas se cocultivaron con células 624, células SCC90 o células CaSki diana sin anticuerpos (barras negras) o en presencia de anticuerpos anti-MHC de clase I (barras grises) o anti-MHC de clase II (barras no sombreadas). Como controles, se transdujeron PBL con TCR de DMF5 y se cocultivaron con células 624 o se transdujeron con TCR anti-MAGE A3 y se cocultivaron con células 526-CIITA sin anticuerpos o en presencia de anticuerpos anti-MHC de clase I o anti-MHC de clase II. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 5. Tal como se muestra en la figura 5, las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) reconocieron específicamente líneas de células tumorales HPV 16⁺ y este reconocimiento se bloqueó por anticuerpos anti-MHC de clase I.

50

55

En un experimento separado, se cocultivaron células efectoras transducidas con células CaSki, células SCC90, células SCC152 o células 624 diana a varias razones de efector:diana. Se usaron células efectoras no transducidas como control negativo. Los resultados se muestran en las figuras 6A-6D. Tal como se muestra en las figuras 6A-6D, los PBL transducidos con un vector de expresión recombinante que codifica para el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) demostraron destrucción específica de líneas tumorales HPV 16⁺ HLA-A2⁺.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) tienen una avidéz funcional similar al TCR DCA2E6 anti-HPV 16 E6. Este ejemplo también demuestra que las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) demostraron mayor producción de IFN- γ en el cocultivo con células CaSki y SCC152 pero no con células SCC90 en comparación con células transducidas con el TCR DCA2E6.

60

65

Se transdujeron PBL con un vector de expresión recombinante que codifica para TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) o DCA2E6. Las células transducidas se cocultivaron con células T2 sometidas a impulso sin péptido o con concentraciones de péptido HPV 16 E7₁₁₋₁₉ o péptido HPV 16 E6₂₉₋₃₈ que oscilan entre 1 μ M y 1 pM.

Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en las figuras 7A y 7B. Tal como se muestran en las figuras 7A y 7B, los PBL transducidos para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) tienen avidéz funcional similar al TCR de DCA2E6 anti-HPV 16 E6. Los resultados obtenidos con las células de un segundo donante fueron similares.

5 En un experimento separado, se transdujeron PBL para expresar TCR modificado con LVL-Cys (β/α) (SEQ ID NO: 38) o DCA2E6. Se usaron células no transducidas como control negativo. Las células se cocultivaron con células 624, células CaSki, células SCC90 o células SCC152 diana. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 8A. Tal como se muestra en la figura 8A, las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con LVL-Cys (β/α) demostraron mayor producción de IFN- γ en el cocultivo con células CaSki y SCC152 pero no con células SCC90 en comparación con células transducidas con el TCR DCA2E6.

10 En un experimento separado, se transdujeron PBL para expresar el TCR modificado con Cys (β/α) (SEQ ID NO: 9, 24 y 27) o DCA2E6. Se usaron células no transducidas como control negativo. Las células se cocultivaron con células 293-A2 diana sometidas a impulso con péptido HPV 16 E6²⁹⁻³⁸ (control), células 293-A2 sometidas a impulso con péptido HPV 16 E7¹¹⁻¹⁹, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células Alb, células Ane, células Panc1 o células SiHa. Se midió IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 8B. Tal como se muestra en la figura 8B, las células T de sangre periférica transducidas para expresar el TCR modificado con Cys (β/α) demostraron mayor producción de IFN- γ en el cocultivo con células CaSki y SCC152 pero no con células SCC90 en comparación con células transducidas con el TCR DCA2E6.

15 El uso de los términos “un” y “una” y “el” o “la” y “al menos uno” y referentes plurales en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse como que cubre tanto lo singular como lo plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. 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”) debe interpretarse como que significa un elemento seleccionado de los elementos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique de otro modo 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 de otro modo. La relación de intervalos de valores en el presente documento se propone específicamente que sirva como un método abreviado para referirse de manera individual a cada valor separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”), proporcionado en el presente documento, se propone específicamente para ilustrar mejor la invención y no posee ninguna limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indique ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

40

Declaración en cuanto a la investigación y desarrollo promocionado federalmente

Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno de los Estados Unidos con los números de proyecto ZIABC010984-5 y ZIABC011479 por el Instituto Nacional de Salud, Instituto Nacional del Cáncer. El Gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos en esta invención.

45

Listado de secuencias

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

50

<120> RECEPTORES DE CÉLULAS T ANTI-PAPILOMAVIRUS 16 E7 HUMANO

<130> 720940

55

<150> documento US 62/004335

<151> 29-05-2014

<160> 40

60

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 98

65

<212> PRT

ES 2 784 237 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

5

<400> 1

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

10 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Sintética

<400> 2

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr

20 1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

30 <400> 3

Thr Ser Gly Phe Asn Gly

1 5

<210> 4

35 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Sintética

<400> 4

Asn Val Leu Asp Gly Leu
 1 5

5 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Sintética

<400> 5

Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn Arg Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 6

25 **Ser Gly His Asp Thr**
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

35 <400> 7

Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu
 1 5

40 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

<400> 8

Ala Ser Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe
 50 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

60 <400> 9

ES 2 784 237 T3

Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
 20 25 30

Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
 35 40 45

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

Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
 65 70 75 80

Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
 85 90 95

Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn
 100 105 110

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

5 <210> 10
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<220>
 <221> MISC_FEATURE

15 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Ala o Gly

<400> 10

ES 2 784 237 T3

Met Xaa Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
 85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

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

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 130 135

<210> 11

<211> 135

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 11

ES 2 784 237 T3

Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100 105 110

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

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
130 135

<210> 12

<211> 267

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 12

Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
1 5 10 15

Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
20 25 30

Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
35 40 45

Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser

ES 2 784 237 T3

50

55

60

Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
85 90 95

Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn
100 105 110

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

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
130 135 140

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

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

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
180 185 190

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
195 200 205

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys
210 215 220

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

Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
245 250 255

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

<210> 13

<211> 314

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 13

ES 2 784 237 T3

Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
 85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe 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

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

ES 2 784 237 T3

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> 14

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 14

Asn 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

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

15 <210> 15

<211> 179

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Sintética

ES 2 784 237 T3

<400> 15

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

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

5

<210> 16
<211> 137
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Xaa es Thr o Cys

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
<223> Xaa es Ser, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp

25

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(114)

ES 2 784 237 T3

<223> Xaa es Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (115)..(115)

<223> Xaa es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp

<400> 16

Asn 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 Xaa
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 Xaa
100 105 110

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

10 Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135

<210> 17

<211> 137

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

20 <400> 17

ES 2 784 237 T3

Asn 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
 115 120 125

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135

<210> 18

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa es Ser o Cys

15

<400> 18

ES 2 784 237 T3

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 Xaa 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> 19

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 19

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

ES 2 784 237 T3

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> 20
 <211> 308
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 20

Met Ala Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
65 70 75 80

ES 2 784 237 T3

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe 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

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> 21

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 21

ES 2 784 237 T3

Asn 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 Leu
 100 105 110

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

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135

<210> 22

<211> 263

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 22

Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
 20 25 30

ES 2 784 237 T3

Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
35 40 45

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

Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
85 90 95

Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn
100 105 110

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

Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
130 135 140

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val
145 150 155 160

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu
165 170 175

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser
180 185 190

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

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

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

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

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260

<210> 23

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 23

ES 2 784 237 T3

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 Cys 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> 24

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 24

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

ES 2 784 237 T3

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 Cys
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
115 120 125

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135

<210> 25
<211> 137
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 25

Asn 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 Cys
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

ES 2 784 237 T3

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 Leu
100 105 110

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

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135

<210> 26

<211> 263

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 26

Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
1 5 10 15

Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
20 25 30

Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
35 40 45

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

Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
85 90 95

Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn
100 105 110

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

Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
130 135 140

ES 2 784 237 T3

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val
145 150 155 160

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
165 170 175

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser
180 185 190

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

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

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

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

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260

<210> 27
<211> 308
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 27

Met Ala Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn

ES 2 784 237 T3

85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe 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

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 Cys
 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> 28
 <211> 27
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 28

ES 2 784 237 T3

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

<210> 29

<211> 598

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 29

Met Ala Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
 85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe 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 2 784 237 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 Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
 305 310 315 320
 Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
 325 330 335
 Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr
 340 345 350
 Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala
 355 360 365
 Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu
 370 375 380
 Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr
 385 390 395 400
 Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu
 405 410 415

ES 2 784 237 T3

Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met
 420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn Arg
 435 440 445

Leu Ala Phe Gly Lys Gly Asn Gln Val Val Val Ile Pro Asn Ile Gln
 450 455 460

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp
 465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro
 485 490 495

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
 500 505 510

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn
 515 520 525

Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr
 530 535 540

Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser
 545 550 555 560

Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu Val Ile Val
 565 570 575

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr
 580 585 590

Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 595

<210> 30

<211> 598

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 30

Met Ala Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 784 237 T3

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

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

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

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
 85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe 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

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 Cys
 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

ES 2 784 237 T3

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 Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
 305 310 315 320

Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
 325 330 335

Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr
 340 345 350

Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala
 355 360 365

Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu
 370 375 380

Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr
 385 390 395 400

Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu
 405 410 415

Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met
 420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn Arg
 435 440 445

Leu Ala Phe Gly Lys Gly Asn Gln Val Val Val Ile Pro Asn Ile Gln
 450 455 460

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp
 465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro
 485 490 495

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp
 500 505 510

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn

ES 2 784 237 T3

515	520	525										
Gln Thr Ser Phe Thr Cys	Gln Asp Ile Phe Lys	Glu Thr Asn Ala Thr										
530	535	540										
Tyr Pro Ser Ser Asp	Val Pro Cys Asp	Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser										
545	550	555										
Phe Glu Thr Asp	Met Asn Leu Asn Phe	Gln Asn Leu Leu Val Ile Val										
	565	570	575									
Leu Arg Ile Leu Leu Leu	Lys Val Ala Gly Phe	Asn Leu Leu Met Thr										
	580	585	590									
Leu Arg Leu Trp Ser Ser												
595												

5 <210> 31
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

10 <400> 31

atgtggggag ttttccttct ttatgtttcc atgaagatgg gaggcactac aggacaaaac	60
attgaccagc ccaactgagat gacagctacg gaaggtgccca ttgtccagat caactgcacg	120
taccagacat ctgggttcaa cgggctgttc tggtagcagc aacatgctgg cgaagcacc	180
acatttctgt cttacaatgt tctggatggg ttggaggaga aaggctcgtt ttcttcattc	240
cttagtcggt ctaaagggta cagttacctc cttttgaagg agctccagat gaaagactct	300
gcctcttacc tctgtgcttc cgtagatggg aacaacagac tcgcttttgg gaaggggaac	360
caagtgggtg tcataccaaa tatccagaac cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac	420
tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta ttcaccgatt ttgatttctca aacaaatgtg	480
tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct	540
atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtgca	600
aacgccttca acaacagcat tattccagaa gacaccttct tcccagccc agaaagtcc	660
tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaac	720
ctgtcagtga ttgggttccg aatcctcctc ctgaaagtgg ccgggtttaa tctgctcatg	780
acgctgcggc tgtggtccag ctga	804

15 <210> 32
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 32

ES 2 784 237 T3

atgggccccg ggctcctctg ctgggcaactg ctttgtctcc tgggagcagc cttagtggac 60
gctggagtca cccaaagtcc cacacacctg atcaaacga gaggacagca agtgactctg 120
agatgctctc ctaagtctgg gcatgacact gtgtcctggg accaacaggc cctgggtcag 180
gggccccagt ttatctttca gtattatgag gaggaagaga gacagagagg caacttcctc 240
gatcgattct caggtcacca gttccctaac tatagctctg agctgaatgt gaacgccttg 300
ttgctggggg actcggccct ctatctctgt gccagcagct tgggatggcg ggggggcccgt 360
tacaatgagc agttcttcgg gccagggaca cggctcaccg tgctagagga cctgaaaaac 420
gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa 480
aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg 540
tgggtgaatg ggaaggaggc gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag 600
cagccccgcc tcaatgactc cagatactgc ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc 660
ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 720
aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cctgtcaccg agatcgtcag cgccgaggcc 780
tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc 840
accatcctct atgagatcct gctaggaag gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc 900
ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag gattccagag gctag 945

<210> 33

<211> 795

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 33

atgtgggggtg tcttcctttt gtacgtcagc atgaagatgg gaggcactac tgggcaaac 60
atagatcagc ctaccgaaat gactgctacc gagggagcca ttgtccaaat caactgcacc 120
tatcagacta gcggcttcaa tggactcttc tggtagcaac agcatgcggg cgaagcacct 180
accttcttgt cctataatgt cttggatggt ctccaagaga aaggcagatt ctccagtttc 240
ctcagccgga gcaagggata ctcatatctt ctctgaaag agcttcagat gaaggattct 300
gcatcctatc tctgtgcttc agtcgatggc aataaccgac tcgccttttg aaaagggaaat 360
caagtggtcg tcataccgaa tattcagaac cccgaaccag ccgtatatca gttgaaggac 420
ccaagatctc aggatagtac actctgtttg tttacggact ttgactcaca aatcaacgtc 480
ccgaagacta tggaaagtgg tacgttcacg acagataaga cggttctgga catgaaggct 540
atggactcaa agagcaacgg ggcaattgct tggccaacc agacaagctt tacctgtcag 600
gacattttta aggagactaa tgctacttat ccctccagcg acgttccgtg tgatgcgact 660
cttaccgaga agtcttttga gaccgatatg aatctcaact tccagaatct gctggtgatc 720
gttctgcgga tcctgcttct gaaggttgca ggattcaatc ttcttatgac tctccggctc 780
15 tggctctcat gataa 795

ES 2 784 237 T3

<210> 34
 <211> 924
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Sintética

<400> 34

10 atggccccgg ggcttttgtg ttgggccttg ctttgtttgc ttggggcagg cttggtggat 60
 gctggagtca cacagtcacc cacacacctc attaaaacca ggggacaaca agtcactctg 120
 cgctgcagtc ctaagtcagg coatgacaca gtttcctggg atcaacaggc tctggggcag 180
 ggccctcagt tcattttcca atattacgag gaagaggaac gccaacgcgg taatttcccc 240
 gatcggttct ctgggcacca gttcccaaac tactcaagtg agttgaacgt aaatgctctc 300
 ctctcggag actccgccct ctacttgtgt gccagttctc ttggttggcg gggcggccga 360
 tacaatgaac aattttttgg acctggtact cggctgaccg tgctagagga cctgcgcaac 420
 gtcacccac caaaggctcag tttgttttag ccatcaaagg cggagatcgc caacaaacag 480
 aaagctacgc tcgtgtgttt ggctcggggc ttcttccag accacgtaga actttcctgg 540
 tgggtcaatg gaaaggaggt tcattccgga gtgtccactg atccccaagc gtacaaggaa 600
 tccaactata gctactgtct ctcatctcgg ctccgggtga gtgcgacatt ctggcataat 660
 cctcggaaac actttcgatg ccaagtgcag tttcatgggt tgagcgagga agacaagtgg 720
 cccgagggca gtcctaaacc agtcactcaa aacataagcg ccgagggcatg gggtagagcc 780
 gattgtggga ttactagcgc ttcataccaa caaggggtat tgagcgctac aattctttac 840
 gaaattctcc tcggcaaggc gacgctctac gccgtactgg tgtctactct cgtggttatg 900
 gcaatggtga aacggaaaaa cagc 924

<210> 35
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Sintética

<400> 35

20

ES 2 784 237 T3

atgtgggggtg tcttcctttt gtacgtcagc atgaagatgg gaggcactac tgggcaaaac 60
 atagatcagc ctaccgaaat gactgctacc gagggagcca ttgtccaaat caactgcacc 120
 tatcagacta gcggcttcaa tggactcttc tggtagcaac agcatgcggg cgaagcacct 180
 accttcttgt cctataatgt cttggatggt ctgcaagaga aaggcagatt ctccagtctc 240
 ctgagccgga gcaagggata ctcatatctt ctctgaaag agcttcagat gaaggattct 300
 gcatcctatc tctgtgcttc agtcgatggc aataaccgac tcgcctttgg aaaagggat 360
 caagtggcgc tcataccgaa tattcagaac cccgaaccag ccgtatatca gttgaaggac 420
 ccaagatctc aggatagtac actctgcttg tttacggact ttgactcaca aatcaacgctc 480
 ccgaagacta tggaaagtgg tacgttcatc acagataagt gcgttctgga catgaaggct 540
 atggactcaa agagcaacgg ggcaattgct tggccaacc agacaagctt tacctgtcag 600
 gacattttta aggagactaa tgctacttat ccctccagcg acgttccgtg tgatgcgact 660
 cttaccgaga agtcttttga gaccgatatg aatctcaact tccagaatct gctggtgatc 720
 gttctgcgga tcctgcttct gaaggttgca ggattcaatc ttcttatgac tctccggctc 780
 tggctctcat gataa 795

<210> 36
 <211> 924
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 36

atggccccgg ggcttttgtg ttgggccttg ctttgtttgc ttggggcagg cttggtggat 60
 gctggagtca cacagtcacc cacacacctc attaaaacca ggggacaaca agtcactctg 120
 cgctgcagtc ctaagtcagg ccatgacaca gtttctcggg atcaacaggc tctggggcag 180
 ggccctcagt tcattttcca atattacgag gaagaggaac gccaacgcgg taatttccc 240
 gatcggttct ctgggcacca gttcccaaac tactcaagtg agttgaacgt aaatgctctc 300
 ctctcggag actccgccct ctacttgtgt gccagtctc ttggttggcg gggcgccga 360
 tacaatgaac aattttttgg acctggtact cggctgaccg tgctagagga cctgcgcaac 420
 gtcaccccac caaaggtcag tttgtttgag ccatcaaagg cggagatcgc caacaaacag 480
 aaagctacgc tcgtgtgttt ggctcggggc ttcttcccag accacgtaga actttcctgg 540
 tgggtcaatg gaaaggaggc tcattccgga gtgtgcactg atccccaaagc gtacaaggaa 600
 tccaactata gctactgtct ctcatctcgg ctccgggtga gtgcgacatt ctggcataat 660
 cctcggaaac actttcgatg ccaagtgcag tttcatgggt tgagcgagga agacaagtgg 720
 cccgagggca gtcctaaacc agtcactcaa aacataagcg ccgagggcatg gggtagagcc 780
 gattgtggga ttactagcgc ttcatacca caaggggtat tgagcgctac aattctttac 840
 gaaattctcc tcggcaaggc gacgctctac gccgtactgg tgtctactct cgtggttatg 900
 15 gcaatggtga aacggaaaaa cagc 924

ES 2 784 237 T3

<210> 37
 <211> 7310
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Sintética

<400> 37

10
 ccatggcccc ggggcttttg tgttgggcct tgctttgttt gcttggggca ggcttgggtgg 60
 atgctggagt cacacagtca cccacacacc tcattaaaac caggggacaa caagtcactc 120
 tgcgctgcag tcctaagtca ggccatgaca cagtttcctg gtatcaacag gctctggggc 180
 agggccctca gttcattttc caatattacg aggaagagga acgccaacgc ggtaatttcc 240
 ccgatcggtt ctctggggcac cagttcccaa actactcaag tgagttgaac gtaaagtctc 300
 tcctcctcgg agaactccgcc ctctacttgt gtgccagttc tcttggttgg cggggcggcc 360
 gatacaatga acaatttttt ggacctggtc ctcggtgac cgtgctagag gacctgcgca 420
 acgtcacccc accaaaggtc agtttgtttg agccatcaaa ggccgagatc gccaacaaac 480
 agaaagctac gctcgtgtgt ttggctcggg gcttcttccc agaccacgta gaactttcct 540
 ggtgggtcaa tggaaaggag gttcattccg gagtgtccac tgatcccaa gcgtacaagg 600
 aatccaacta tagctactgt ctctcatctc ggctccgggt gagtgcgaca ttctggcata 660
 atcctcggaa ccactttcga tgccaagtgc agtttcatgg gttgagcgag gaagacaagt 720
 ggcccgaggg cagtcctaaa ccagtcactc aaaacataag cgccgaggca tggggtagag 780
 ccgattgtgg gattactagc gcttcatacc aacaaggggt attgagcgct acaattcttt 840
 acgaaattct cctcggcaag gcgacgctct acgccgtact ggtgtctact ctcgtggtta 900
 tggcaatggt gaaacggaaa aacagcagag caaaagaag tggttctggc gcgacgaatt 960
 ttagtttgct taagcaagcc ggagatgtgg aggaaaatcc tggaccgatg tgggggtgtct 1020
 tccttttgta cgtcagcatg aagatgggag gcactactgg gcaaaacata gatcagccta 1080
 ccgaaatgac tgctaccgag ggagccattg tccaaatcaa ctgcacctat cagactagcg 1140
 gcttcaatgg actcttctgg taccaacagc atgcgggcca agcacctacc ttcttgcct 1200
 ataatgtctt ggatgggtctc gaagagaaag gcagattctc cagtttcctc agccggagca 1260
 agggatactc atatcttctc ctgaaagagc ttcagatgaa ggattctgca tcctatctct 1320

ES 2 784 237 T3

gtgcttcagt cgatggcaat aaccgactcg cctttggaaa agggaatcaa gtggtcgtca 1380
 taccgaatat tcagaacccc gaaccagccg tatatcagtt gaaggacca agatctcagg 1440
 atagtacact ctgtttgttt acggactttg actcacaat caacgtcccg aagactatgg 1500
 aaagtggtag gttcatcaca gataagacgg ttctggacat gaaggctatg gactcaaaga 1560
 gcaacggggc aattgcttgg tccaaccaga caagctttac ctgtcaggac atttttaagg 1620
 agactaatgc tacttatccc tccagcgacg ttccggtgga tgcgactctt accgagaagt 1680
 cttttgagac cgatatgaat ctcaacttcc agaactctgt ggtgatcgtt ctgcggatcc 1740
 tgcttctgaa ggttgacagga ttcaatcttc ttatgactct ccggtctctg tcttcatgat 1800
 aagaattctg cagtcgacgg taccgcgggc ccgggatccg ataaaataaa agattttatt 1860
 tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta 1920
 agtaacgcc a ttttgcaagg catggaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca 1980
 aggttaggaa cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2040
 cctgccccgg ctcagggcca agaacagatg gtccccagat gcggtcccgc cctcagcagt 2100
 ttctagagaa ccatcagatg tttccagggt gcccgaagga cctgaaaatg accctgtgcc 2160
 ttatttgaac taaccaatca gttcgttct cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga 2220
 gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggcgcgcca gtccctccgat agactgcgtc 2280
 gccgggtac ccgtgtatcc aataaacct cttgcagttg catccgactt gtggtctcgc 2340
 tgttccttgg gaggtctcc tctgagtgat tgactaccgc tcagcggggg tctttcatgg 2400
 gtaacagttt cttgaagttg gagaacaaca ttctgagggt aggagtcaa tattaagtaa 2460
 tcctgactca attagccact gttttgaatc cacatactcc aatactcctg aaatccatcg 2520
 atggagtcca ttatggacag cgcagaaaga gctggggaga attgtgaaat tgttatccgc 2580
 tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaat 2640
 gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 2700
 tgcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg 2760
 ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcgcgag 2820
 cggatcagc tcaactcaaag gcgtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag 2880
 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 2940
 tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 3000
 agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 3060
 tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 3120
 cgggaagcgt ggcgcttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 3180

ES 2 784 237 T3

ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 3240
 ccggtaaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 3300
 ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtagcggg tgctacagag ttcttgaagt 3360
 ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 3420
 cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggtgta 3480
 gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag 3540
 atcctttgat ctttctacg gggctctgacg ctcagtgga cgaaaactca cgtaagga 3600
 ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 3660
 gttttaaact aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa 3720
 tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc 3780
 ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 3840
 taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa 3900
 gggccgagcg cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt 3960
 gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg 4020
 ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 4080
 aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg 4140
 gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtggt atcaactcatg gttatggcag 4200
 cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 4260
 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccgcgacc gagttgctct tgcccggcgt 4320
 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac 4380
 gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac 4440
 ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 4500
 caaaaacag aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa 4560
 tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 4620
 gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 4680
 cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 4740
 ataggcgtat cacgagggcc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct 4800
 gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 4860
 aagcccgta gggcgcgtca gcgggtggtt gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg 4920
 catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg 4980
 taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt cgcattcag gctgcgcaac tgttgggaag 5040
 ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa 5100

ES 2 784 237 T3

ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcgc 5160
 aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc cggccacgg ggcctgccac 5220
 catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg cgagcccgat cttccccatc 5280
 ggtgatgtcg gcgataatag cgcagcaac cgcacctgtg gcgccgggtga tgccggccac 5340
 gatgctccg gcgtagaggc gattagtcca atttgttaa gacaggatat cagtggcca 5400
 ggctctagtt ttgactcaac aatatcacca gctgaagcct atagagtacg agccatagat 5460
 aaaataaaag attttattta gtctccagaa aaagggggga atgaaagacc ccacctgtag 5520
 gtttggaag ctagcttaag taacgccatt ttgcaaggca tggaaaatac ataactgaga 5580
 atagagaagt tcagatcaag gtttagaaca gagagacagc agaatatggg ccaaacagga 5640
 tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt cccagatgc 5700
 ggtcccggcc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccaggggtc cccaaggacc 5760
 tgaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 5820
 gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 5880
 ctccgataga ctgcgtcgcc cgggtaccgg tattcccaat aaagcctctt gctgtttgca 5940
 tccgaatcgt ggactcgctg atccttgga gggctctctc agattgattg actgcccacc 6000
 tcgggggtct ttcatttga ggtccaccg agatttgag acccctgccc aggaccacc 6060
 gaccccccg ccgggaggtg agctggccag cggctgttcc gtgtctgtct ctgtctttgt 6120
 gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg tactagttag ctaactagct 6180
 ctgtatctgg cggaccctg gtggaactga cgagttcggg acaccggcc gcaaccctgg 6240
 gagacgtccc agggacttcg ggggcccgtt ttgtggcccg acctgagtc taaaatcccg 6300
 atcgtttagg actctttggt gcacccccct tagaggagg atatgtggt ctggtaggag 6360
 acgagaacct aaaacagttc ccgcctccgt ctgaatttt gctttcgggt tgggaccgaa 6420
 gccgcgccg gcgtctgtc tgctgcagca tcgttctgtg ttgtctctgt ctgactgtgt 6480
 ttctgtatth gtctgaaaat atgggcccgg gctagcctgt taccactccc ttaagtttga 6540
 ccttaggtca ctggaaagat gtcgagcggg tcgctcacia ccagtcggta gatgtcaaga 6600
 agagacgttg ggttaccttc tgctctgcag aatggccaac cttaacgct ggatggccgc 6660
 gagacggcac cttaaccga gacctcatca cccaggttaa gatcaaggct tttcacctg 6720
 gccgcgatgg acaccagac cagtcacct acatcgtgac ctgggaagcc ttggcttttg 6780
 acccccctcc ctgggtcaag ccctttgtac accctaagcc tccgcctcct cttcctccat 6840
 ccgccccgct tctccccctt gaacctctc gttcgacccc gcctcgatcc tccctttatc 6900
 cagccctcac tcttctcta ggcgccccca tatggccata tgagatctta tatggggcac 6960
 ccccgccct tgtaaaacttc cctgaccctg acatgacaag agttactaac agcccctctc 7020
 tccaagctca ctacaggct ctctacttag tccagcacga agtctggaga cctctggcgg 7080
 cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtacctca cccttaccga gtcggcgaca 7140
 cagtgtgggt ccgcccacac cagactaaga acctagaacc tcgctggaaa ggaccttaca 7200
 cagtctgtct gaccaccccc accgccctca aagtagacgg catcgcagct tggatacacg 7260
 ccgcccacgt gaaggctgcc gacccgggg gtggaccatc ctctagaccg 7310

ES 2 784 237 T3

<210> 38
 <211> 7310
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 38

```

ccatggcccc ggggcttttg tgttgggcct tgctttgtht gcttggggca ggcttggtgg      60
atgctggagt cacacagtca cccacacacc tcattaaaac caggggacaa caagtcactc      120
tgcgctgcag tcctaagtca ggccatgaca cagtttctctg gtatcaacag gctctggggc      180
agggccctca gttcattttc caatattacg aggaagagga acgccaacgc ggtaatttcc      240
ccgatcgggt ctctggggcac cagttcccaa actactcaag tgagttgaac gtaaagtctc      300
tcctcctcgg agactccgcc ctctacttgt gtgccagttc tcttggttgg cggggcggcc      360
gatacaatga acaatthttt ggacctggtg ctcggtgac cgtgctagag gacctgcgca      420
acgtcacccc accaaaggtc agtttgthtg agccatcaaa ggcggagatc gccaacaaac      480
agaaagtctac gctcgtgtgt ttggctcggg gcttcttccc agaccacgta gaactttcct      540
ggtgggtcaa tggaaaggag gttcattccg gagtgtgcac tgatcccaa gcgtacaagg      600
aatccaacta tagctactgt ctctcatctc ggctccgggt gagtgcgaca ttctggcata      660
atcctcggaa ccactttcga tgccaagtgc agtttcatgg gttgagcgag gaagacaagt      720
ggcccggagg cagtcctaaa ccagtcactc aaaacataag cgccgaggca tggggtagag      780
ccgattgtgg gattactagc gcttcatacc aacaaggggt attgagcgct acaattcttt      840
acgaaattct cctcggcaag gcgacgctct acgccgtact ggtgtctact ctcgtggtta      900
tggcaatggt gaaacggaaa aacagcagag ccaaaagaag tggttctggc gcgacgaatt      960
ttagthtgct taagcaagcc ggagatgtgg aggaaaatcc tggaccgatg tgggggtgtct     1020
tcctthtgta cgtcagcatg aagatgggag gcactactgg gcaaaacata gatcagccta     1080
ccgaaatgac tgctaccgag ggagccattg tccaaatcaa ctgcacctat cagactagcg     1140
gcttcaatgg actcttctgg taccaacagc atgcgggcca agcacctacc ttcttgcct     1200
ataatgtctt ggatgggtctc gaagagaaag gcagattctc cagthtctc agccggagca     1260
    
```

ES 2 784 237 T3

agggatactc atatcttctc ctgaaagagc ttcagatgaa ggattctgca tcctatctct 1320
 gtgcttcagt cgatggcaat aaccgactcg cctttggaaa agggaatcaa gtggtcgtca 1380
 taccgaatat tcagaacccc gaaccagccg tatatcagtt gaaggaccca agatctcagg 1440
 atagtacact ctgtttgttt acggactttg actcacaaat caacgtcccc aagactatgg 1500
 aaagtggtag gttcatcaca gataagtgcg ttctggacat gaaggctatg gactcaaaga 1560
 gcaacggggc aattgcttgg tccaaccaga caagctttac ctgtcaggac atttttaagg 1620
 agactaatgc tacttatccc tccagcgacg ttccgtgtga tgcgactctt accgagaagt 1680
 cttttgagac cgatatgaat ctcaacttcc agaactctgt ggtgatcgtt ctgicggatcc 1740
 tgcttctgaa ggttgcaagg ttcaatcttc ttatgactct cgggctctgg tcttcatgat 1800
 aagaattctg cagtcgacgg taccgcgggc cggggatccg ataaaataaa agattttatt 1860
 tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta 1920
 agtaacgcca ttttgcaagg catgaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca 1980
 aggttaggaa cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2040
 cctgccccgg ctcagggcca agaacagatg gtccccagat gcggtccccg cctcagcagt 2100
 ttctagagaa ccatcagatg tttccagggt gccccaggga cctgaaaatg accctgtgcc 2160
 ttatttgaac taaccaatca gttcgttctc cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga 2220
 gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggcgcgcca gtcctccgat agactgcgtc 2280
 gcccggttac ccgtgtatcc aataaacctt cttgcagttg catccgactt gtggtctcgc 2340
 tgttccttgg gaggtctccc tctgagtgat tgactaccgg tcagcggggg tctttcatgg 2400
 gtaacagttt cttgaagttg gagaacaaca ttctgagggt aggagtcgaa tattaagtaa 2460
 tcctgactca attagccact gttttgaatc cacatactcc aatactcctg aaatccatcg 2520
 atggagtcca ttatggacag cgcagaaaaga gctggggaga attgtgaaat tgttatccgc 2580
 tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaaagt taaagcctgg ggtgcctaat 2640
 gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 2700
 tgctcgtcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagagggcgt ttgcgtattg 2760
 ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcgcgag 2820
 cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac gggtatccac agaactcagg gataacgcag 2880
 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 2940
 tggcgttttt ccataggttc cgcctccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 3000
 agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 3060
 tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 3120

ES 2 784 237 T3

cgggaagcgt ggcgccttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 3180
 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 3240
 ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 3300
 ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 3360
 ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 3420
 cagttacctt cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggtgta 3480
 gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag 3540
 atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctccagtgga cgaaaactca cgtaaggga 3600
 ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 3660
 gttttaaatac aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa 3720
 tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc 3780
 ccgctcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 3840
 taccgcgaga cccacgctca cgggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa 3900
 gggccgagcg cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt 3960
 gccgggaagc tagagtaagt agttcgcagc ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg 4020
 ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 4080
 aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg 4140
 gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag 4200
 cactgcaata ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 4260
 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcacc gagttgctct tgcccggcgt 4320
 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac 4380
 gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac 4440
 ccaactcgtc acccaactga tottcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 4500
 caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa 4560
 tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 4620
 gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 4680
 cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 4740
 ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcggttcgg tgatgacggt gaaaacctct 4800
 gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 4860
 aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtggtg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg 4920
 catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg 4980
 taaggagaaa ataccgcatc aggcgccatt cgcattcag gctgcgcaac tgttgggaag 5040

ES 2 784 237 T3

ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa 5100
 ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcgc 5160
 aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc ccggccacgg ggcctgccac 5220
 catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg cgagcccgat cttccccatc 5280
 ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgccgggta tgccggccac 5340
 gatgctcggc gcgtagaggc gattagtcca atttgttaa gacaggatat cagtggcca 5400
 ggctctagtt ttgactcaac aatatcacca gctgaagcct atagagtacg agccatagat 5460
 aaaataaaag attttattta gtctccagaa aaagggggga atgaaagacc ccacctgtag 5520
 gtttgccaag ctagcttaag taacgccatt ttgcaaggca tggaaaatac ataactgaga 5580
 atagagaagt tcagatcaag gttaggaaca gagagacagc agaatatggg ccaaacagga 5640
 tatctgtggg aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc 5700
 ggtcccggcc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccaggggtc cccaaggacc 5760
 tgaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttgc 5820
 gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 5880
 ctccgataga ctgcgtcgcc cgggtaccgg tattccaat aaagcctctt gctgtttgca 5940
 tccgaatcgt ggactcgctg atccttggga gggctctctc agattgattg actgcccacc 6000
 tcgggggtct tcatttggga ggttccaccg agatttggag acccctgccc agggaccacc 6060
 gaccccccg ccgggaggtg agctggccag cggctgttcc gtgtctgtct ctgtctttgt 6120
 gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg tactagttag ctaactagct 6180
 ctgtatctgg cggaccctg gtggaactga cgagttcggg acaccggcc gcaaccctgg 6240
 gagacgtccc agggacttcg ggggcccgtt ttgtggcccg acctgagtcc taaaatcccg 6300
 atcgtttagg actctttggt gcacccccct tagaggaggg atatgtggtt ctggtaggag 6360
 acgagaacct aaaacagttc ccgcctccgt ctgaattttt gctttcgggt tgggaccgaa 6420
 gccgcgccgc gcgtcttgtc tgctgcagca tcgttctgtg ttgtctctgt ctgactgtgt 6480
 ttctgtatth gtctgaaaat atgggcccgg gctagcctgt taccactccc ttaagtttga 6540
 ccttaggtca ctggaagat gtcgagcggg tcgctcacia ccagtcggta gatgtcaaga 6600
 agagacgttg ggttacctc tgctctgcag aatggccaac cttaacgtc ggatggcccg 6660
 gagacggcac cttaaccga gacctcatc cccaggttaa gatcaaggtc tttcacctg 6720
 gcccgcatgg acaccagac caggtcccct acatcgtgac ctgggaagcc ttggcttttg 6780
 acccccctcc ctgggtcaag ccctttgtac accctaagcc tccgcctcct cttcctccat 6840
 ccgcccgtc tctccccctt gaacctctc gttcgacccc gcctcgatcc tccctttatc 6900

ES 2 784 237 T3

cagccctcac tccttctcta ggcgccccca tatggccata tgagatctta tatggggcac 6960
 ccccgccctc tgtaaacttc cctgaccctg acatgacaag agttactaac agcccccttc 7020
 tccaagctca cttacaggct ctctacttag tccagcacga agtctggaga cctctggcgg 7080
 cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtagctca cccttaccga gtcggcgaca 7140
 cagtgtgggt ccgccgacac cagactaaga acctagaacc tcgctggaaa ggaccttaca 7200
 cagtctgctg gaccaccccc accgccctca aagtagacgg catcgagctg tggatacacg 7260
 ccgcccacgt gaaggctgcc gaccccgggg gtggaccatc ctctagaccg 7310

<210> 39
 <211> 1800
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 39

atggccccgg ggcttttgtg ttgggccttg ctttgtttgc ttggggcagg cttggtggat 60
 gctggagtca cacagtcacc cacacacctc attaaaacca ggggacaaca agtcactctg 120
 cgctgcagtc ctaagtcagg ccatgacaca gtttctctgg atcaacaggc tctggggcag 180
 ggccctcagt tcattttcca atattacgag gaagaggaac gccaacgcgg taatttcccc 240
 gatcggttct ctgggcacca gttcccaaac tactcaagtg agttgaacgt aatgctctc 300
 ctctcggag actccgccct ctacttgtgt gccagtctc ttggttgccg gggcgccga 360
 tacaatgaac aatTTTTTgg acctggtact cggctgaccg tgctagagga cctgcgcaac 420
 gtcacccccac caaaggtcag tttgtttgag ccatcaaagg cggagatcgc caacaaacag 480
 aaagctacgc tcgtgtgttt ggctcggggc ttcttcccag accacgtaga actttcctgg 540
 tgggtcaatg gaaaggagggt tcattccgga gtgtccactg atccccaaag gtacaaggaa 600
 tccaactata gctactgtct ctcatctcgg ctccgggtga gtgcgacatt ctggcataat 660
 cctcggaaac actttcgatg ccaagtgcag tttcatgggt tgagcgagga agacaagtgg 720
 cccgagggca gtcctaaacc agtcactcaa aacataagcg ccgagggcat gggtagagcc 780
 gattgtggga ttactagcgc ttcataccaa caaggggtat tgagcgctac aattctttac 840
 gaaattctcc tcggcaaggc gacgctctac gccgtactgg tgtctactct cgtggttatg 900
 gcaatggtga aacggaaaaa cagcagagcc aaaagaagtg gttctggcgc gacgaatTTT 960
 agtttgctta agcaagccgg agatgtggag gaaaatcctg gaccgatgtg ggggtgtcttc 1020
 cttttgtacg tcagcatgaa gatgggaggc actactgggc aaaacataga tcagcctacc 1080
 gaaatgactg ctaccgaggg agccattgtc caaatcaact gcacctatca gactagcggc 1140
 ttcaatggac tcttctggta ccaacagcat gcgggcgaag cacctacctt cttgtcctat 1200

ES 2 784 237 T3

aatgtcttgg atggtctcga agagaaaggc agattctcca gtttcctcag cgggagcaag 1260
 ggatactcat atcttctcct gaaagagctt cagatgaagg attctgcatc ctatctctgt 1320
 gcttcagtcg atggcaataa ccgactcggc tttggaaaag ggaatcaagt ggtcgctata 1380
 ccgaatattc agaaccccgga accagccgta tatcagttga aggacccaag atctcaggat 1440
 agtacactct gtttgtttac ggactttgac tcacaaatca acgtcccgaa gactatggaa 1500
 agtggtagct tcatcacaga taagacggtt ctggacatga aggctatgga ctcaaagagc 1560
 aacggggcaa ttgcttggtc caaccagaca agctttacct gtcaggacat ttttaaggag 1620
 actaatgcta cttatccctc cagcgacggt ccgtgtgatg cgactcttac cgagaagtct 1680
 tttgagaccg atatgaatct caacttccag aatctgctgg tgatcgttct gcggatcctg 1740
 cttctgaagg ttgcaggatt caatcttctt atgactctcc ggctctggtc ttcatgataa 1800

<210> 40
 <211> 1800
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 40

atggccccgg ggcttttgtg ttgggccttg ctttgtttgc ttggggcagg cttggtggat 60
 gctggagtca cacagtcacc cacacacctc attaaaacca ggggacaaca agtcactctg 120
 cgctgcagtc ctaagtcagg ccatgacaca gtttcctggg atcaacaggc tctggggcag 180
 ggccctcagt tcattttcca atattacgag gaagaggaac gccaacgcgg taatttcccc 240
 gatcggttct ctgggcacca gttcccaaac tactcaagtg agttgaactg aatgctctc 300
 ctctcggag actccgccct ctacttgtgt gccagttctc ttggttggcg gggcgccga 360
 tacaatgaac aattttttgg acctggtact cggctgaccg tgctagagga cctgcgcaac 420
 gtcaccccac caaaggtcag tttgttttag ccatcaaagg cggagatcgc caacaaacag 480
 aaagctacgc tcgtgtgttt ggctcggggc ttcttcccag accacgtaga actttcctgg 540
 tgggtcaatg gaaaggaggt tcattccgga gtgtgactg atccccaagc gtacaaggaa 600
 tccaactata gctactgtct ctcatctcgg ctccgggtga gtgogacatt ctggcataat 660
 cctcgggaacc actttcgatg ccaagtgcag tttcatgggt tgagcgagga agacaagtgg 720
 cccgagggca gtcctaaacc agtcactcaa aacataagcg ccgagggcatg gggtagagcc 780
 gattgtggga ttactagcgc ttcataccaa caaggggtat tgagcgctac aattctttac 840
 gaaattctcc tcggcaaggc gacgctctac gccgtactgg tgtctactct cgtggttatg 900
 gcaatggtga aacggaaaaa cagcagagcc aaaagaagtg gttctggcgc gacgaatttt 960

ES 2 784 237 T3

agtttgctta agcaagccgg agatgtggag gaaaatcctg gaccgatgtg ggggtgtcttc	1020
cttttgtagc tcagcatgaa gatgggaggc actactgggc aaaacataga tcagcctacc	1080
gaaatgactg ctaccgaggg agccattgtc caaatcaact gcacctatca gactagcggc	1140
ttcaatggac tcttctggta ccaacagcat gcggggaag cacctacctt cttgtcctat	1200
aatgtcttgg atggtctcga agagaaaggc agattctcca gtttcctcag cggagcaag	1260
ggatactcat atcttctcct gaaagagctt cagatgaagg attctgcatc ctatctctgt	1320
gcttcagtgc atggcaataa ccgactcgcc tttggaaaag ggaatcaagt ggtcgtcata	1380
ccgaatattc agaaccccgga accagccgta tatcagttga aggaccaag atctcaggat	1440
agtacactct gtttgtttac ggactttgac tcacaaatca acgtcccga gactatggaa	1500
agtggtacgt tcatcacaga taagtgcggt ctggacatga aggctatgga ctcaaagagc	1560
aacggggcaa ttgcttggtc caaccagaca agctttacct gtcaggacat ttttaaggag	1620
actaatgcta cttatccctc cagcgacggt ccgtgtgatg cgactcttac cgagaagtct	1680
tttgagaccg atatgaatct caacttccag aatctgctgg tgatcgttct gcggatcctg	1740
cttctgaagg ttgcaggatt caatcttctt atgactctcc ggctctggtc ttcataataa	1800

REIVINDICACIONES

- 5 1. Receptor de células T (TCR) que comprende una región variable humana y una región constante murina, o una variante funcional del TCR, en el que el TCR y la variante funcional comprenden la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, y tienen especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16 E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2, en el que opcionalmente el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de (a) SEQ ID NO: 9 y (b) SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 es Ala o Gly.
- 15 2. Receptor de células T (TCR) aislado o purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, y que tiene especificidad antigénica para el papilomavirus humano (HPV) 16 E7₁₁₋₁₉ SEQ ID NO: 2, en el que opcionalmente el TCR:
- 20 (i) comprende una región constante humana; y/o
- 25 (ii) comprende las secuencias de aminoácidos de (a) SEQ ID NO: 9 y (b) SEQ ID NO: 10, en la que X en la posición 2 es Ala o Gly.
- 30 3. TCR o variante funcional según la reivindicación 1 o TCR aislado o purificado según la reivindicación 2, que comprende las secuencias de aminoácidos de
- (a) SEQ ID NO: 16, en la que
- 35 (i) X en la posición 48 es Thr o Cys;
- (ii) X en la posición 112 es Ser, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;
- (iii) X en la posición 114 es Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; y
- 40 (iv) X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; y
- (b) SEQ ID NO: 18, en la que X en la posición 56 es Ser o Cys.
- 45 4. TCR o variante funcional según la reivindicación 1 ó 3 o TCR aislado o purificado según la reivindicación 2 ó 3, que comprende las secuencias de aminoácidos de:
- (I)
- 50 (a) una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, 17, 21, 24 y 25; y
- (b) una cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 19 y 23
- (II)
- 55 (a) (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 22, (iii) SEQ ID NO: 26, (iv) SEQ ID NO: 9 y 24, (v) SEQ ID NO: 9 y 16, o (vi) SEQ ID NO: 9 y 17; y
- (b) (i) SEQ ID NO: 10 y 18, o (ii) una cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 20 y 27; o
- 60 (III) SEQ ID NO: 29 ó 30.
- 65 5. Polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional de (i) TCR o variante funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4 o (ii) TCR aislado o purificado según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la porción funcional se une específicamente a HPV 16 E7₁₁₋₁₉ y comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de

aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, en el que opcionalmente la porción funcional comprende la(s) secuencia(s) de aminoácidos de:

5 (I) (a) SEQ ID NO: 9, (b) SEQ ID NO: 10 o (c) SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly, y cuando X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Gly, el polipéptido se aísla o purifica; o

10 (II)

(a) (i) SEQ ID NO: 9 y 24; (ii) SEQ ID NO: 9 y 17; (iii) SEQ ID NO: 9 y 16; (iv) SEQ ID NO: 10 y 18; o (v) una cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 13, 20, 22, 26, 27, 29 y 30;

15 (b) SEQ ID NO: 12 y 13;

(c) SEQ ID NO: 20 y 22;

(d) SEQ ID NO: 26 y 27;

20 (e) SEQ ID NO: 9, 24 y 27;

(f) SEQ ID NO: 9, 17 y 20; o

25 (g) SEQ ID NO: 9, 10, 16 y 18,

en el que polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una o ambas de SEQ ID NO: 12 y 13 se aísla o purifica.

6. 30 Proteína aislada o purificada que se une específicamente a HPV 16 E7¹¹⁻¹⁹ y que comprende una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8, en la que opcionalmente la proteína:

35 (i) es una proteína de fusión o un anticuerpo recombinante;

40 (ii) 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, en la que (A) X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Ala o Gly, y (B) comprendiendo la proteína SEQ ID NO: 9 y 10, en la que X en la posición 2 de SEQ ID NO: 10 es Gly, se aísla o purifica; o

45 (iii) comprende una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 12, (ii) SEQ ID NO: 22, (iii) SEQ ID NO: 26, (iv) SEQ ID NO: 9 y 16, (v) SEQ ID NO: 9 y 17, o (vi) SEQ ID NO: 9 y 24, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID NO: 10 y 18, o (ii) una cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 20 y 27,

50 en la que la proteína que comprende SEQ ID NO: 12 y 13 se aísla o purifica.

7. Proteína que comprende SEQ ID NO: 29 ó 30.

8. 55 (a) Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR o la variante funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, polipéptido según la reivindicación 5 o proteína según la reivindicación 6 ó 7, o

(b) ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, polipéptido según la reivindicación 5 o proteína según la reivindicación 6 ó 7, en los que opcionalmente:

60 (i) el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, o ambas SEQ ID NO: 31 y 32; o

65 (ii) el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de (1) una cualquiera de las de 33-36, (2) ambas SEQ ID NO: 33 y 34, o (3) ambas SEQ ID NO: 35 y 36.

9. Vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8, en el que opcionalmente:
- 5 (i) la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta se coloca 5' en la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa; o
- (ii) el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 37, 38, 39 ó 40.
10. Célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, en la que opcionalmente la célula es humana.
11. Población de células que comprende al menos una célula huésped según la reivindicación 10.
12. Anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo de un TCR, en el que el epítipo se forma por la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO: 8.
13. Composición farmacéutica que comprende el TCR o la variante funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, TCR aislado o purificado según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, polipéptido según la reivindicación 5, proteína según la reivindicación 6 ó 7, ácido nucleico según la reivindicación 8, vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, célula huésped según la reivindicación 10 o población de células según la reivindicación 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Método *in vitro* de detección de la presencia de un estado en un mamífero, que comprende:
- 30 (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con el TCR o la variante funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, el TCR aislado o purificado según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, el polipéptido según la reivindicación 5, la proteína según la reivindicación 6 ó 7, la célula huésped según la reivindicación 10 o la población de células según la reivindicación 11, en el que la célula huésped y la población de células expresan el TCR o la variante funcional, formando de este modo un complejo, y
- 35 (b) 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 HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV.
- 40 15. TCR o variante funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, TCR aislado o purificado según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, polipéptido según la reivindicación 5, proteína según la reivindicación 6 ó 7, ácido nucleico según la reivindicación 8, vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, célula huésped según la reivindicación 10, población de células según la reivindicación 11 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 HPV 16 o tumor maligno previo positivo a HPV, en el que opcionalmente el estado es:
- 45 (i) cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, conducto anal, anorrecto, vagina, vulva o pene; o
- 50 (ii) cáncer positivo a HPV 16.

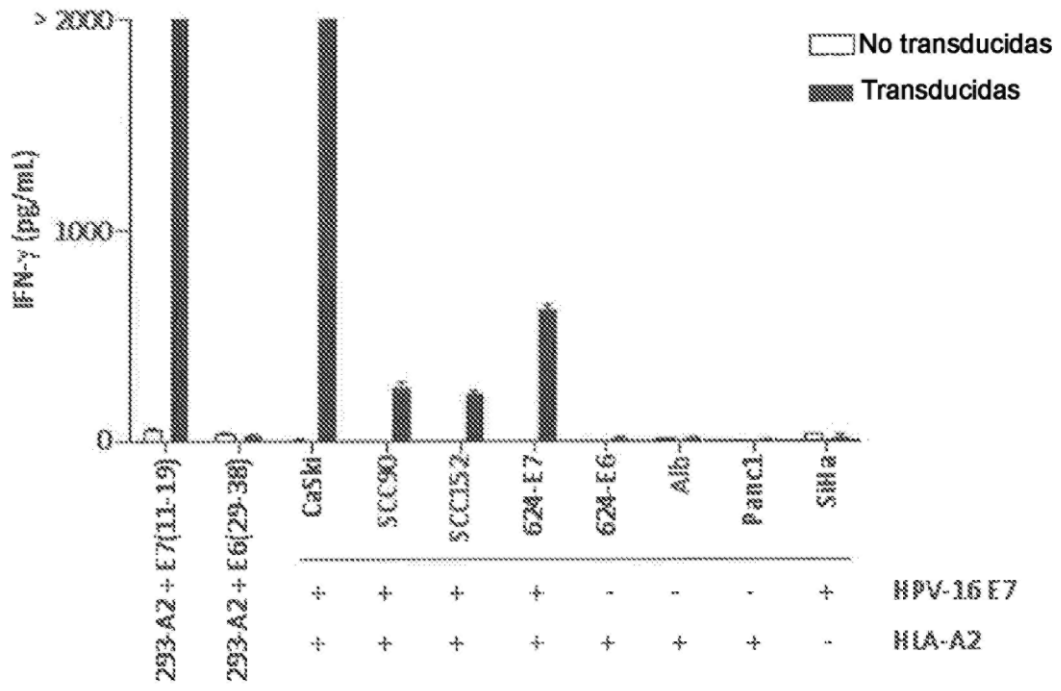


FIG. 1

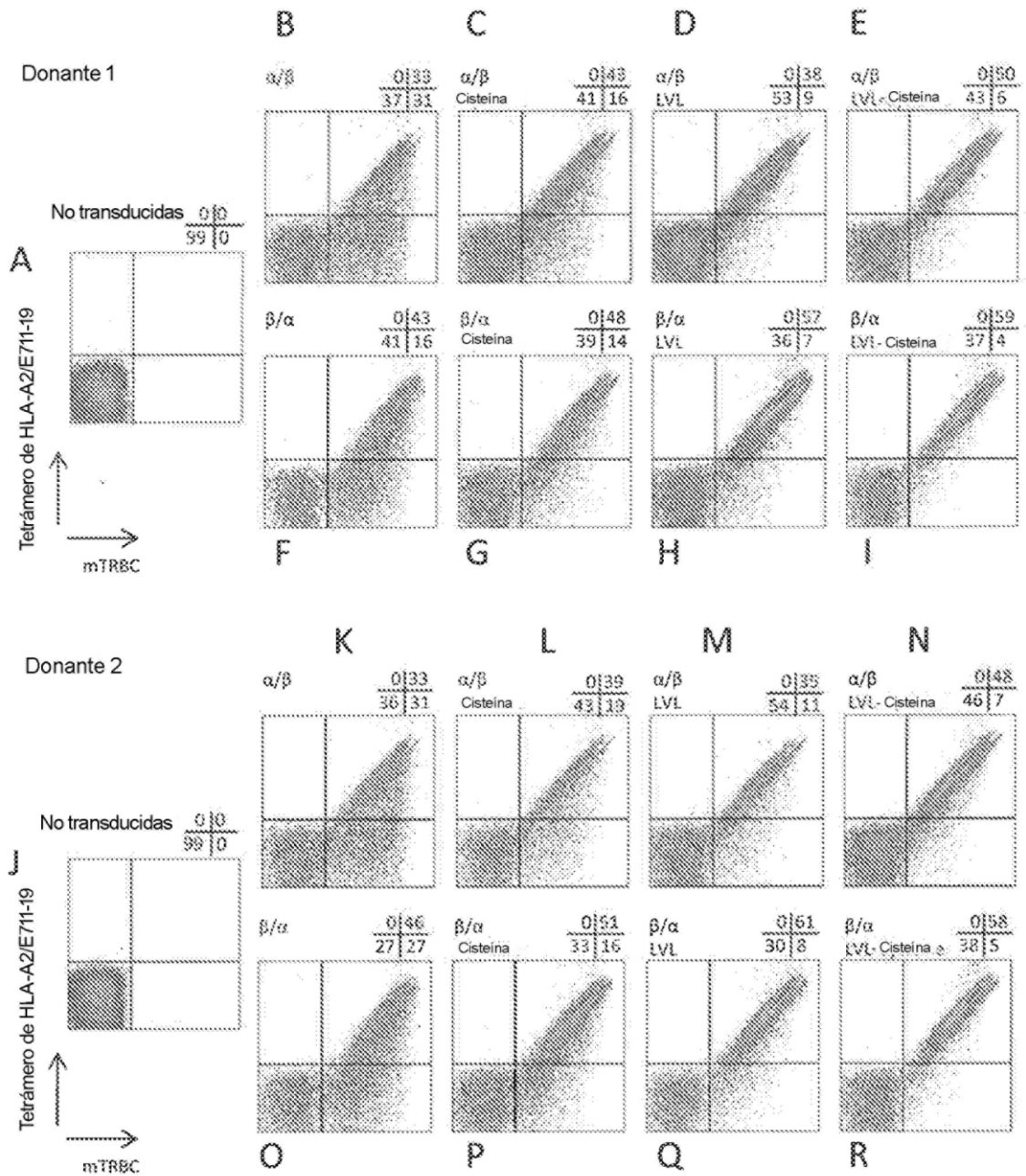


FIG. 2

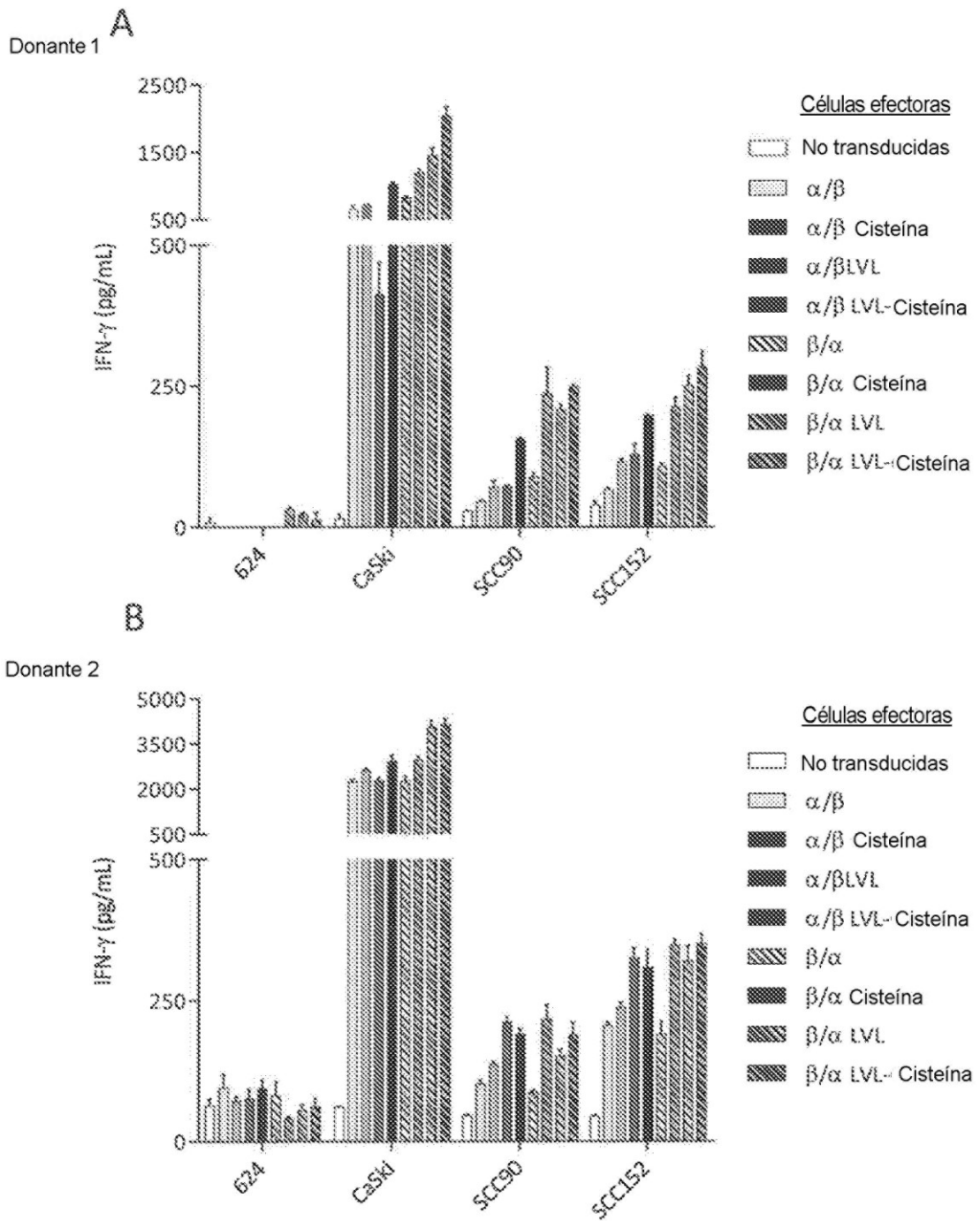


FIG. 3

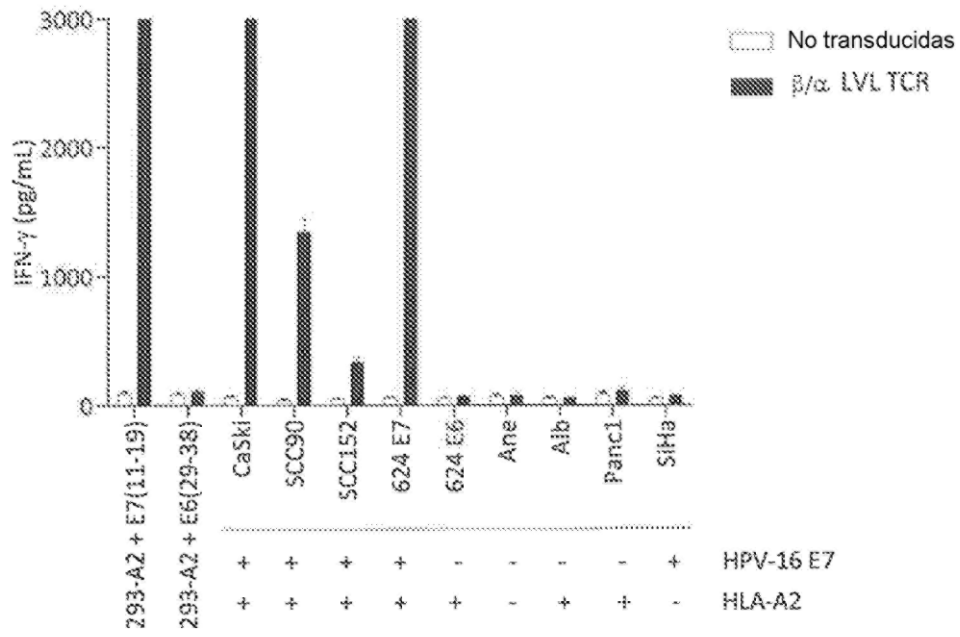


FIG. 4

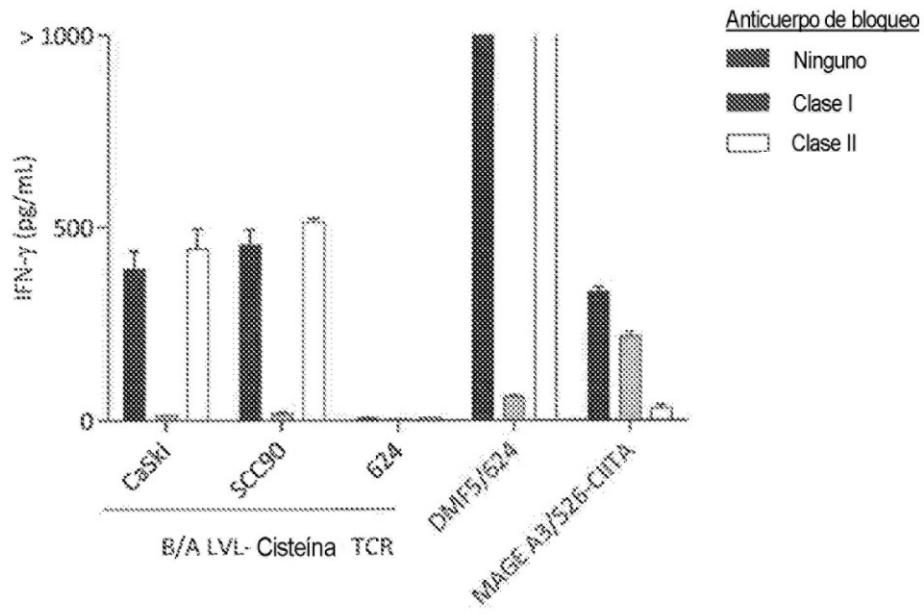


FIG. 5

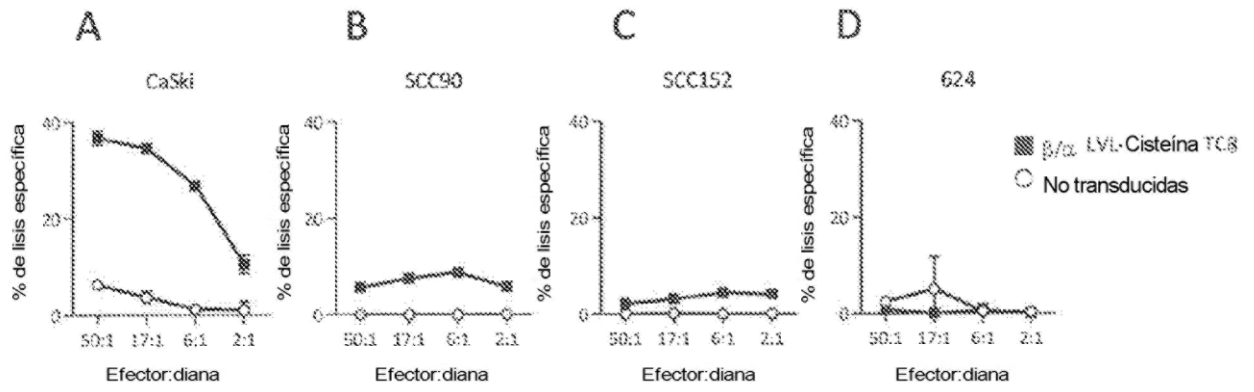


FIG. 6

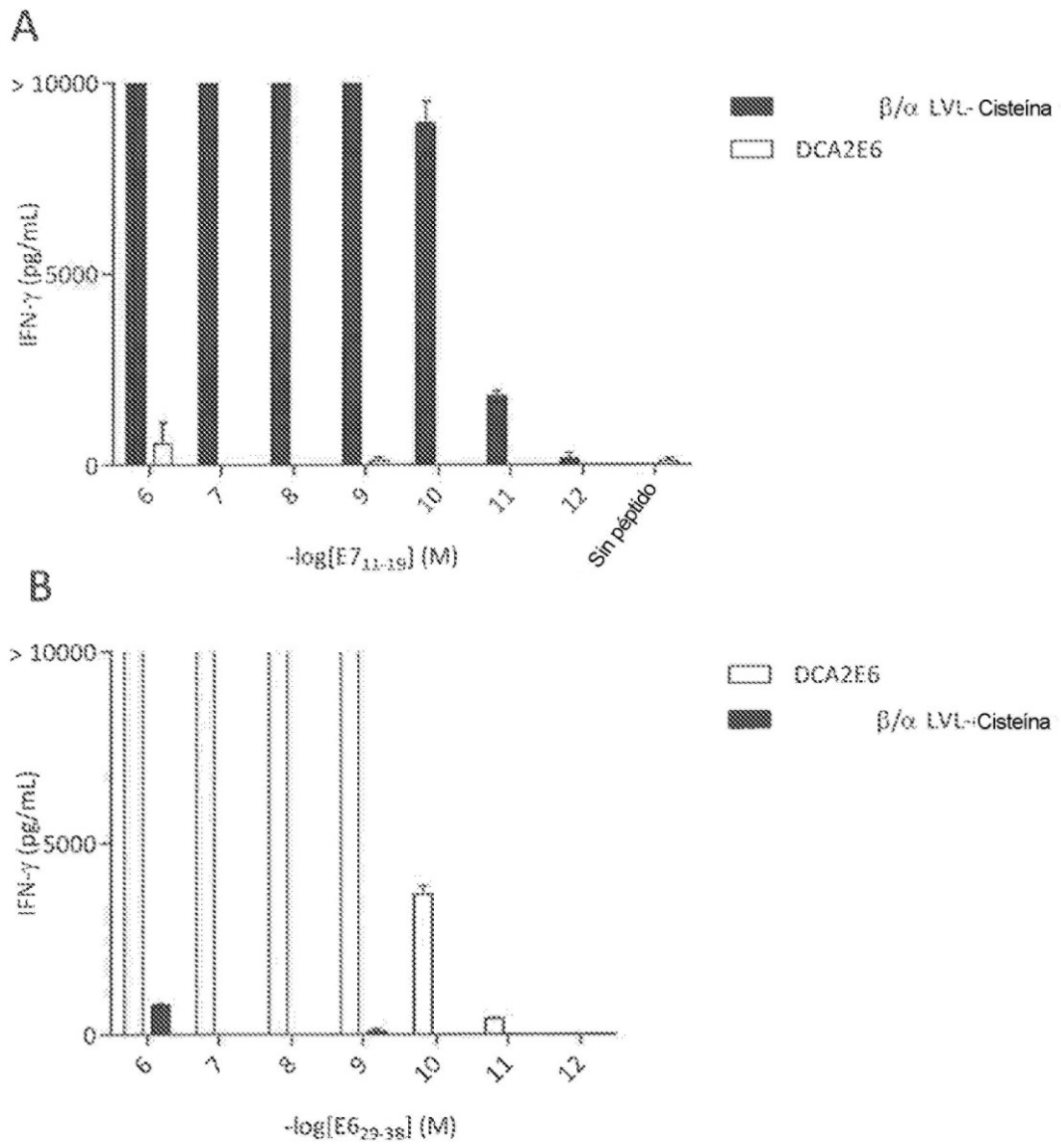


FIG. 7

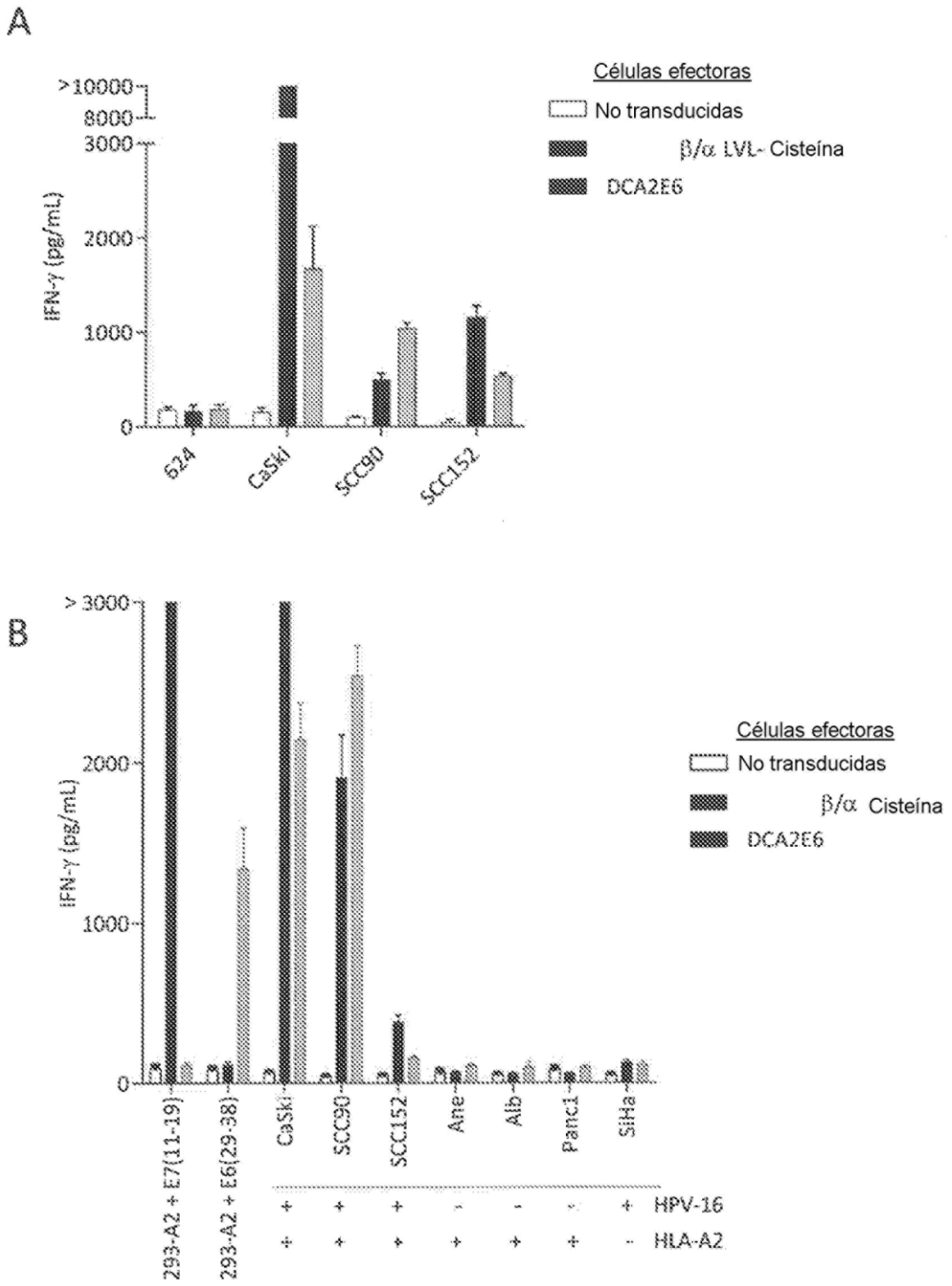


FIG. 8