

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 725**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/EP2016/055518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146618**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16713750 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3271382**

54 Título: **Procedimiento de detección de nuevos epítomos de células T inmunogénicas y aislamiento de nuevos receptores de células T específicas de antígeno mediante una biblioteca de células de MHC**

30 Prioridad:

16.03.2015 EP 15159212

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

29.10.2020

73 Titular/es:

**MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT
(50.0%)**

**Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE y**

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LORENZ, FELIX;
UCKERT, WOLFGANG;
ELLINGER, CHRISTIAN y
SCHENDEL, DOLORES**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 790 725 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

Procedimiento de detección de nuevos epítomos de células T inmunogénicas y aislamiento de nuevos receptores de células T específicas de antígeno mediante una biblioteca de células de MHC

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia, en particular, a la terapia adoptiva con células T, la terapia génica con receptores de células T (TCR) y la vacunación. La invención proporciona un procedimiento para preparar un ácido nucleico que codifica la construcción de la cadena alfa de TCR (TRA) y la construcción de la cadena beta de TCR (TRB) de una construcción de TCR específica para un epítomo de un antígeno presentado en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que comprende poner en contacto células T aisladas de un donante con una biblioteca de células presentadoras de antígeno (APC) artificiales que comprende células que expresan todos los alelos de MHC I o MHC II presentes en el donante, preferiblemente, en células K562, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 1. La construcción de TCR puede expresarse en una célula T, que es útil para la terapia adoptiva con células T, por ejemplo, de cáncer, infecciones virales o enfermedades autoinmunes. La invención proporciona además un procedimiento para identificar el epítomo reconocido por dicho TCR. Los epítomos inmunogénicos reconocidos por dichos TCR pueden usarse para desarrollar formulaciones de vacunas para inducir inmunidad de células T específicas de antígeno en pacientes. La invención proporciona además pares de construcciones de TCR y epítomos inmunogénicos respectivos obtenidos mediante el procedimiento de la invención, en el que los epítomos son de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano (VPH) 16 (también designado virus del papiloma alfa 9).

25 [0002] La terapia génica con receptores de células T (TCR) es una prometedora estrategia inmunoterapéutica para tratar una variedad de indicaciones relacionadas con virus y cáncer. Un obstáculo clave es la falta de disponibilidad de TCR potentes a analizar en entornos preclínicos y clínicos. Los procedimientos actuales para detectar y aislar TCR específicos de antígeno tienen limitaciones técnicas, están restringidos a ciertos MHC o requieren conocimiento previo del epítomo antigénico. La elección del antígeno diana es otro factor clave para el éxito de las inmunoterapias. El reconocimiento de antígenos, que se expresan específicamente en tejido tumoral pero no en tejido normal, son de particular interés.

30 [0003] Las terapias adoptivas con células T se basan en la activación *ex vivo* y expansión de células T para generar células T efectoras específicas de antígeno para la reinfusión en el paciente (1). Este proceso puede ir acompañado de modificación genética de células T con nuevos receptores de antígeno. Los rápidos protocolos de expansión *ex vivo* permiten la generación de grandes cantidades de células T para romper las barreras inmunosupresoras del microambiente tumoral para eliminar las células diana. La superación de barreras inmunosupresoras puede conducir a la captación de células tumorales lisadas por APC y la presentación de más antígenos, un proceso llamado propagación del epítomo. Esto puede ir seguido por el cebado *de novo* de células T autólogas y la reactivación de células T anérgicas que amplifican la respuesta inmunitaria antitumoral, que era inducida por la terapia adoptiva con células T. Las terapias adoptivas con células T que utilizan células T genéticamente no modificadas y modificadas por el receptor de antígeno se han utilizado con éxito para tratar el cáncer y las enfermedades asociadas a los virus, refractarias a otros tratamientos (2).

45 [0004] Una segunda estrategia para proporcionar inmunidad de células T a un paciente es la aplicación de una vacuna. Las vacunas proporcionan inmunidad adquirida a patógenos o cánceres particulares y la introducción en el mercado de muchas vacunas ha llevado a una disminución impresionante en la morbilidad y mortalidad causada por numerosas enfermedades potencialmente mortales. Para el desarrollo de nuevas vacunas profilácticas y terapéuticas, es un requisito previo identificar antígenos, epítomos y elementos de restricción de MHC, que inducen respuestas de células T que pueden proporcionar protección frente a y eliminación de células patógenas que expresan dichos antígenos. La identificación de epítomos antigénicos, que son procesados endógenamente y presentados por células patógenas y que son reconocidos por los TCR específicos de antígeno, permite el desarrollo de nuevas formulaciones de vacunas para inducir inmunidad específica de antígeno.

50 [0005] A continuación, se revisan procedimientos actuales para identificar y aislar TCR específicos de antígeno y para identificar epítomos antigénicos, que inducen respuestas de células T.

55 [0006] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son la fuente primaria de las células T para el análisis *in vitro*. Para el cribado, se pueden aislar fácilmente grandes cantidades de células T de PBMC de sangre de pacientes o donantes sanos. En comparación, las células T aisladas de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) están disponibles en cantidades limitadas de biopsias tumorales. Las biopsias solo pueden obtenerse de tumores sólidos (3,4). El análisis de secuencia directa de TCR de PBMC o TIL puede generar datos masivos sobre las secuencias de TCR. La predicción de la especificidad de TCR y el reconocimiento de antígeno de estos conjuntos de datos sigue siendo imposible (5). Para aislar los TCR con la especificidad deseada de las muestras de células T, es necesario introducir un paso de enriquecimiento específico de antígeno antes de analizar las secuencias de TCR. Además, es útil realizar ensayos funcionales para confirmar la especificidad de antígeno de las células T antes del aislamiento de TCR (6). Los enfoques estándar para enriquecer las células T se basan en la estimulación *in vitro* específica de antígeno para expandir células T específicas en cultivo. Una estrategia de estimulación *in vitro* de células T específicas de antígeno es la adición de péptidos al cultivo de células T, que se unen a las moléculas MHC I. Las

células en cultivo presentan los péptidos entre sí y las células T CD8⁺ específicas de antígeno crecen. Sin embargo, las estimulaciones de péptidos, que a menudo se realizan a concentraciones no fisiológicas, pueden conducir a la sobreestimulación y la muerte celular inducida por la activación de las células T que albergan TCR de alta afinidad a péptido/MHC (pMHC) I (7). Además, se requiere el conocimiento de la secuencia del epítipo, procesando propiedades y restricción de unión a MHC I. Además, es necesaria la presencia de células T específicas de péptido dentro de muestras de PBMC o TIL. Por lo tanto, el cribado de células T específicas de péptidos con baja frecuencia de precursores puede ser limitado e impide la identificación de nuevas combinaciones de antígeno inmunogénico-MHC I. Las pruebas funcionales de células T para la especificidad del antígeno y la restricción de MHC generalmente se llevan a cabo con clones de células T individuales. Después de la expansión y el enriquecimiento, los clones de células T individuales se pueden cultivar en cantidades suficientes. Un factor, que debe tenerse en cuenta al aplicar cultivos de células T, es la influencia de las condiciones de cultivo a largo plazo en células T resultantes (8). La capacidad de crecimiento de las células T con un fenotipo más diferenciado (Tem y Teff) es limitada y restringe la expansión *in vitro*. El cultivo a largo plazo podría conducir a la pérdida de potentes TCR de clones de células T, que ya han encontrado pMHC I *in vivo* y se han expandido y diferenciado en el donante.

[0007] Por lo tanto, los cultivos de células T a largo plazo pueden introducir una preferencia a favor del crecimiento de células T no diferenciadas con alta capacidad de expansión.

[0008] La detección y clasificación de células T específicas de antígeno es una etapa crítica para el aislamiento de nuevos TCR específicos de antígeno. El enorme repertorio de TCR con especificidades distintas para pMHC condujo al desarrollo de multímeros de MHC solubles como reactivos para teñir células T específicas para un pMHC conocido (9-11). Los multímeros se usan para clasificar las células T específicas de antígeno. Los multímeros permiten la tinción directa de células T específicas para el pMHC deseado (12,13). Sin embargo, se requiere un conocimiento previo de la restricción a MHC y la especificidad del péptido para cribar células T específicas de antígeno dentro de una muestra. El uso de multímeros puede depender de la predicción *in silico* de epítipos de células T y, por lo tanto, alberga el riesgo de aislar TCR específicos para epítipos que no se procesan ni presentan de manera endógena. Además, las células T se seleccionan según su capacidad para unirse al multímero, pero no necesariamente para unirse a un complejo pMHC en la superficie celular. Los multímeros son reactivos hechos a medida que no están fácilmente disponibles para cribar conjuntos de diferentes pMHC.

[0009] En 1997, los grupos de Lemonnier y Perarnau informaron de la generación de un ratón transgénico que expresaba de forma estable una construcción de una sola cadena de la molécula HLA-A*2:01 humana fusionada con β -2 microglobulina (b-2m) (HHD). Además, a los ratones se les eliminaron los genes de MHC I murinos. Por lo tanto, la inmunización da como resultado células T específicas de antígeno restringidas exclusivamente a HHD (14). Desde entonces, los ratones transgénicos con HLA han proporcionado una nueva fuente de células T específicas de antígeno (15). Los antígenos y epítipos humanos, que no son similares en su secuencia a los homólogos murinos, pueden usarse para la vacunación de ratones transgénicos con HLA para obtener respuestas de células T específicas de antígeno en el repertorio no tolerante, ya que las células T de ratón no se eliminaron en el timo y reconocen antígenos humanos como extraños. Los ratones transgénicos con HLA proporcionan una fuente de TCR de alta afinidad que reconocen antígenos propios o similares a los propios, que se han eliminado en el repertorio humano debido a la selección tímica. Se hicieron avances tecnológicos, cuando basado en el modelo de ratón de HHD, se generó el primer ratón transgénico que incluía el repertorio de TCR humano, mientras que, en paralelo, se eliminó el locus de TCR murino (16). Sin embargo, pueden surgir problemas potenciales con el uso de ratones transgénicos de MHC y/o transgénicos del locus de TCR, por ejemplo, es difícil predecir si la selección de timo humano y de ratón sigue o no las mismas reglas. Las moléculas de MHC transgénicas son construcciones artificiales de una cadena que pueden introducir un sesgo para seleccionar TCR funcionalmente restringidos a MHC de cadena única, pero no al complejo MHC I nativo. La inmunización de ratones transgénicos de MHC individuales no refleja una respuesta inmunitaria natural con una selección de seis complejos MHC:I afines. Es probable que existan antígenos, que no contengan, por ejemplo, epítipos HLA-A*02:01. Además, los ratones que llevan el locus de TCR humano carecen de algunas cadenas de TCR, lo que puede ser crucial para reconocer ciertos pMHC I (16). En cambio, la inmunización de ratones que llevan el locus de TCR murino dará como resultado el aislamiento de secuencias de TCR murinas, que pueden ser propensas al rechazo cuando se transfieren a humanos (17,18). Un factor económico importante es la infraestructura necesaria para trabajar con modelos murinos, lo que requiere muchos recursos en cuanto a costes, requisitos reglamentarios y mano de obra.

[0010] El documento WO 2004/011650 A2, Chen et al., 2004, Journal of Virology, 78 (3): 1333-1343 y US 7 026 443 B1 enseñan péptidos E5 del virus del papiloma humano 16. El documento WO 2016/138122 A1 describe secuencias de TCR en el contexto de un procedimiento para diagnosticar enfermedades infecciosas y determinar el estado de HLA usando la secuenciación del receptor inmunitario.

[0011] La terapia génica con TCR exitosa depende de la disponibilidad de nuevos TCR con perfiles de especificidad exquisita. A la luz de esto, los presentes inventores abordaron la necesidad de proporcionar un procedimiento novedoso para identificar y aislar nuevos TCR específicos de antígeno, y definir la especificidad del epítipo y la restricción de MHC de estos TCR. Para el desarrollo de nuevas vacunas, que inducen respuestas de células T específicas de antígeno, existe la necesidad de definir nuevos epítipos inmunogénicos, que pueden ser reconocidos por células T.

[0012] Este problema se resuelve por la presente invención, en particular, mediante la materia de las reivindicaciones.

5 **[0013]** La presente invención proporciona un procedimiento para preparar uno o dos ácidos nucleicos que codifican la construcción de la cadena alfa de TCR (TRA) y la construcción de la cadena beta de TCR (TRB) de una construcción de TCR específica para un epítipo de un antígeno definido presentado en un MHC, que comprende:

10 (a) estimular células T aisladas de un donante humano con células presentadoras de antígeno (APC) profesionales que presentan epítopos de dicho antígeno definido, para enriquecer células T específicas de antígeno; y

15 (b) poner en contacto dichas células T enriquecidas de células T específicas de antígeno de la etapa (a) con una biblioteca de células, en la que cada célula expresa un único alelo de MHC, en el que la biblioteca comprende células que expresan todos los alelos de MHC I o MHC II presentes en el donante, y en el que las células de dicha biblioteca presentan epítopos de dicho antígeno definido; y

(c) seleccionar células T activadas por dicho contacto, preferiblemente, en base a un marcador de activación expresado por dichas células T activadas; y

(d) aislar los ácidos nucleicos que codifican la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR de dichas células T.

20 **[0014]** En el contexto de la presente invención "un/una" no se refiere exclusivamente a "uno/a", sino que también abarca "dos o más". Por ejemplo, el procedimiento de la presente invención puede usarse para preparar uno o más, por ejemplo, dos ácidos nucleicos separados que codifican la TRA y TRB de una construcción de TCR.

25 **[0015]** El término "capaz de unirse específicamente" o "reconocer" o "específico para" un antígeno dado, tal como se usa en el presente documento significa que la construcción de TCR pueden unirse específicamente a y reconocen inmunológicamente dicho epítipo, preferentemente con alta afinidad. La afinidad se puede analizar mediante procedimientos bien conocidos por la persona experta, por ejemplo, por BiaCore.

30 **[0016]** Una de las ventajas de la presente invención es que no se requiere que los epítopos inmunogénicos del antígeno presentado en un alelo de MHC específico sean conocidos. Con el procedimiento de la invención, es posible analizar las respuestas de las células T a los antígenos, donde los epítopos se procesan naturalmente y la presentación puede tener lugar a través de cada MHC posible. Por lo tanto, el procedimiento de la invención puede usarse para identificar un TCR específico para un antígeno definido sin conocimiento previo del epítipo. El antígeno definido puede ser incluso uno de una pluralidad de antígenos, por ejemplo, una pluralidad de antígenos de un virus específico, o todos los antígenos de un virus específico, si las células presentadoras de antígeno en la etapa a y la biblioteca en la etapa b presentan epítopos de dichos antígenos.

35 **[0017]** Una ventaja adicional es que el procedimiento de la invención hace posible la identificación de TCR específicos para epítopos peptídicos inmunodominantes, y proporcionar dichos epítopos peptídicos. Se ha observado que ciertas combinaciones de péptido-MHC (pMHC) inducen una respuesta dominante de células T sobre otras combinaciones de pMHC derivadas del mismo antígeno, aunque se predice que ambas combinaciones tienen altas afinidades de unión. Además, este procedimiento también puede permitir el aislamiento de TCR que reconocen epítopos subdominantes, si el número de PBMC cribadas aumenta ampliamente.

40 **[0018]** Como la terapia de los seres humanos es de mayor interés, se prefiere que el procedimiento se lleve a cabo en el sistema humano, es decir, el donante es humano, y, por consiguiente, se utilizan MHC I o MHC II humano, en particular, moléculas de MHC I, y APC. Por supuesto, también es posible usar células T de un donante murino, que esté restringido a moléculas MHC humanas (14,15) o células T murinas que expresen receptores de células T humanas (16). Alternativamente, se pueden usar otros sistemas, por ejemplo, sistemas completamente murinos, de rata, cabra, conejo, conejillo de indias, si se desea la provisión de un TCR de esa especie.

45 **[0019]** Preferiblemente, las células T estimuladas en la etapa a están en forma de PBMC, es decir, no están separadas de otras células mononucleares. Esto puede ser beneficioso porque proporciona un entorno más natural y excluye la necesidad de etapas de purificación adicionales. También se pueden usar TIL aislados de un donante. Alternativamente, se pueden usar células T purificadas, o células CD4⁺ purificadas o, preferiblemente, células T CD8⁺.

50 **[0020]** Las APCs profesionales son preferiblemente APCs autólogas, es decir, que están aisladas del mismo donante que las PBMC. Sin embargo, también pueden ser APC heterólogas, siempre que compartan al menos un alelo de MHC, preferiblemente, todos los alelos de MHC I o II (preferiblemente MHC I) con el donante. Más preferiblemente, las APC profesionales son células dendríticas, en particular, células dendríticas maduras. Las APC profesionales presentan epítopos del antígeno definido en el MHC después del procesamiento endógeno del antígeno. El antígeno se proporciona preferiblemente al interior de las APC profesionales como ARN, ADN, proteína o polipéptido para permitir el procesamiento endógeno y la presentación por las APC. Por lo tanto, no se requiere un conocimiento previo del epítipo. Por ejemplo, es posible la expresión estable o transitoria después de la transfección.

65

[0021] La estimulación de células T en la etapa a se lleva a cabo durante 7-42 días, más preferiblemente durante 14-28 días. La proporción de PBMC a APC profesionales es preferiblemente de aproximadamente 5:1 a 20:1, lo más preferiblemente, de aproximadamente 10:1. Las células T se estimulan en un medio que contiene citoquinas que favorecen la proliferación de células T; preferiblemente bajas concentraciones de IL-2 (por ejemplo, 15-25 U/ml, preferiblemente, aproximadamente 20 U/ml), IL-7 (por ejemplo, 2,5-7,5 U/ml, preferiblemente, aproximadamente 5 U/ml) o IL-15 para prevenir la proliferación de células T no específicas de antígeno en entornos de cultivo específicos. Las PBMC proliferantes pueden dividirse en proporciones de aproximadamente 1:2 a 3:4. Es posible una segunda estimulación con APC profesionales que presenten un epítipo del antígeno después del procesamiento endógeno.

[0022] Las células enriquecidas para células T específicas de antígeno en la etapa a se ponen en contacto adicionalmente con una biblioteca de células en la etapa b, en la que cada célula expresa un único alelo de MHC, en la que la biblioteca comprende células que expresan todos los alelos de MHC I o II presentes en el donante, y en la que las células de dicha biblioteca presentan epítipos de dicho antígeno definido.

[0023] Se prefiere en toda la invención que el MHC sea MHC I. Las células T estimuladas por estas células, que expresan MHC I, serán células T CD8⁺, y, típicamente, se presentarán epítipos de proteínas intracelulares.

[0024] En una realización preferida, la biblioteca consiste en células K562 que expresan de manera estable un alelo de MHC I cada una. Las bibliotecas de K562 ejemplo se describen a continuación o se describen por Zeng et al. (19) Las células de la biblioteca pueden ser de otro origen que el de las células K562, que comprenden cualquier APC humano o no humano, por ejemplo, líneas celulares linfoblastoides (LCL) o células NIH/3T3.

[0025] La biblioteca de células MHC usada en el presente documento se generó mediante transducción estable de la línea celular humana K562 (20,21) con alelos de MHC I humanos individuales (HLA-A, -B y -C). Las células K562 son de origen eritroleucémico humano y carecen de expresión de alelos endógenos de MHC I y MHC II (22). Sin embargo, expresan la microglobulina β -2 y, tras la expresión transgénica de una cadena α de MHC I, poseen una maquinaria de procesamiento de antígeno y presentación completamente funcional (19, 23, 24). Las células K562 expresan ICAM-1 y LFA-3, que son necesarias para formar una sinapsis inmunitaria efectiva (24). Además, fue posible modificar genéticamente estas células, por ejemplo, mediante transducción retroviral para expresar de forma estable alelos de MHC I individuales e introducir secuencias antigénicas, por ejemplo, mediante transfección con ARN transcrito *in vitro* (ivt).

[0026] En una realización, de este modo, la presente invención también proporciona una biblioteca de células MHC basadas en K562, las células de la cual se pueden emplear en el procedimiento de la invención. Dicha biblioteca comprende células K562, expresando cada célula uno de los siguientes alelos de MHC I:

Biblioteca de células MHC basadas en K562

HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*
01:01	07:02	01:02
02:01	07:04	02:02
03:01	08:01	03:03
03:05	15:01	03:04
11:01	18:01	04:01
23:01	27:05	05:01
24:02	35:01	06:02
26:01	35:08	07:01
29:02	38:01	07:02
31:01	40:01	12:03
33:01	41:02	15:02
66:01	44:02	16:01
68:02	44:03	16:02
68:24	47:01	17:01
	49:01	
	51:01	
	56:01	
	57:01	
	57:03	
	58:01	

[0027] El uso de células K562 como armazón de APC artificiales tiene varias ventajas. En comparación con los LCL, las células K562 carecen de secuencias virales del virus del herpes como el EBV (25,26). Esta es una característica importante del sistema de APC basado en K562 para evitar la activación de células T específicas de EBV durante el análisis de muestras en volumen de células T, que naturalmente pueden contener células T específicas de EBV. En comparación con las APC artificiales acelulares, en un sistema de APC celular, la presentación de pMHC se produce

a niveles fisiológicos en la superficie celular de una membrana celular intacta, que se asemeja al entorno más nativo para la unión a TCR. La expresión dominante de un MHC minimiza el alo-reconocimiento de los TCR. La capacidad de K562 transducida por MHC para presentar pMHC en la superficie celular muestra que el procesamiento de antígenos y la expresión de MHC en K562 parental no es un defecto general, sino debido al silenciamiento del locus endógeno de MHC. Las células K562 expresan un proteasoma constitutivo en comparación con las DC que expresan proteasoma inmunitario, que se asemeja al procesamiento del antígeno por una célula tumoral típica (27). Las células T transducidas con TCR cocultivadas con células K562 en ausencia del antígeno diana no mostraron liberación de IFN γ de base y regulación por incremento de CD137 minimizando la activación inespecífica de las células T.

[0028] Los atributos de células K562 discutidos anteriormente los hace el sistema APC artificial celular preferido para establecer una biblioteca de células MHC como una diana para el análisis de TCR sin conocimiento previo de especificidad de epítipo y restricción a MHC. En principio, cualquier antígeno diana puede expresarse en células K562, que incluye antígenos derivados de patógenos, así como antígenos asociados a tumores (TAA), antígenos de cáncer de testículo (CTA) y antígenos de linaje. Para la inmunoterapia del cáncer, los antígenos específicos de tumor (TSA) son de particular interés para identificar TCR específicos para epítipos virales o epítipos derivados de mutaciones.

[0029] Latouche y Sadelain utilizaron células NIH/3T3 de fibroblastos de ratón adherentes a placa, que expresaban de forma estable alelos de MHC humano individuales (28) y por lo tanto lograban una presentación endógena de los epítipos en el contexto de los complejos de MHC humanos. Las células NIH/3T3 se han utilizado con éxito para expandir las líneas de células T específicas de CMV para su uso en la terapia adoptiva con células T postrasplante (29), y se pueden usar como una biblioteca alternativa en el contexto de la invención.

[0030] Alternativamente, el MHC puede ser MHC II. En ese caso, la biblioteca de células comprende preferiblemente células que expresan MHC II, tales como células K562 transfectadas con un alelo de MHC II cada una. Butler et al. describen una biblioteca de ejemplo. (30) Alternativamente, se pueden usar bibliotecas de células que expresan MHC II individuales que se basan en células B RM3 (Raji) humanas, que se generaron después de mutagénesis aleatoria con metilsulfonato de etano (EMS) para eliminar el locus de MHC II (31). Las células T estimuladas por estas células serán CD4⁺ y, típicamente, se presentarán epítipos de proteínas secretadas, proteínas de diferentes compartimentos celulares, proteínas de membrana o proteínas de presentación cruzada.

[0031] Las células de la biblioteca, en particular las células K562, pueden expresar además moléculas coestimuladoras, por ejemplo, CD40, CD40L, CD70, CD80, CD83, CD86, ICOSL, GITRL, CD137L y/o CD252, de manera que las células pueden adaptarse para el contacto óptimo de subconjuntos de células T. Los conjuntos de moléculas coestimuladoras pueden ser CD80, CD86 y CD137L, o CD80, CD83, CD64 (30) o CD80, CD70 y CD137L (19). Esto puede amplificar la respuesta de las células T para detectar claramente la liberación de IFN γ específica de antígeno y la expresión de CD137 y puede conducir a la detección de un rango más amplio de TCR con respecto a la afinidad. Sin embargo, para aislar TCR de alta afinidad, puede ser preferible que las células de la biblioteca, en particular las células K562, no expresen moléculas coestimuladoras adicionales. Además, las células de la biblioteca, en particular las células K562, pueden expresar moléculas que mejoran el procesamiento y la presentación de antígeno, por ejemplo, HLA-DM y CD74.

[0032] Las células de la biblioteca presentan epítipos del antígeno definido en sus moléculas de MHC después del procesamiento endógeno. Preferiblemente, expresan de manera estable el antígeno completo de longitud completa, por ejemplo, después de la transfección con ARN it que codifica el antígeno. La expresión transitoria también se puede utilizar. En consecuencia, no se requiere conocimiento previo del epítipo.

[0033] El contacto de la biblioteca con células T se realiza durante entre 12 y 36 horas, preferiblemente, 18-22 horas o aproximadamente 20 horas para lograr la activación óptima de células T específicas de antígeno dentro de la muestra de células T. Preferiblemente, se evita la adición de citoquinas durante el contacto para evitar que las células T se activen inespecíficamente.

[0034] Estas células T que portan un TCR específico para un epítipo presentado por las células de la biblioteca están activadas. En consecuencia, se pueden seleccionar en función de un marcador de activación (etapa c), de modo que no se requiere conocimiento previo del epítipo de células T y el elemento de restricción de MHC. Las células T regulan por incremento los marcadores de activación tras el acoplamiento del TCR con el complejo de pMHC afín en las células diana. La señalización de TCR junto con señales coestimuladoras induce la expresión a corto plazo de moléculas de activación como CD25, CD69, CD107, CD137 y/o CD154, que pueden usarse como marcadores para detectar y aislar células T específicas de antígeno (32), por ejemplo, mediante FACS o MACS. Se demostró que CD137 era un marcador específico para el aislamiento de células T CD8⁺ específicas de antígeno (33,34). La clasificación basada en la expresión de CD137, por ejemplo, mediante FACS, es un procedimiento preferido para la selección de células T específicas. En una realización, esto se combina con la medición de la liberación de IFN γ , por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o mediante la captura de citoquinas de IFN γ por FACS. La medición de la liberación de IFN γ , por ejemplo, mediante ELISA, es un procedimiento estándar para evaluar la actividad funcional de las muestras de células T.

[0035] Los ensayos de captura de citoquinas proporcionan una herramienta alternativa para detectar y aislar células T funcionalmente activas sin conocimiento previo de la especificidad de pMHC (35,36). Las células T CD8⁺ activadas a través de pMHC I afin liberan vesículas con citoquinas como IFN γ y TNF α . La detección y el aislamiento de células T individuales tras la secreción de citoquinas se ha facilitado mediante el desarrollo de ensayos de captura de citoquinas en combinación con análisis FACS o MACS (36,37). Los ensayos de captura de citoquinas proporcionan una alternativa atractiva a los marcadores de activación de células T para la clasificación de células T, que se activaron mediante señalización de TCR.

[0036] Después de la selección de las células T activadas, los ácidos nucleicos que codifican la cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR del receptor de células T de dichas células T se aíslan directamente. Por ejemplo, el ARN puede aislarse para generar ADNc a través de la amplificación rápida en 5' de los extremos de ADNc (RACE) de los genes de lafa de TCR y beta de TCR, seguido de la amplificación por PCR. Los productos de PCR pueden clonarse en un plásmido de expresión para transformar bacterias. Puede considerarse que cada colonia bacteriana contiene un vector de secuenciación con un fragmento del gen de alfa de TCR o beta de TCR en PCR. Se puede preparar el ADN del vector de numerosas colonias bacterianas, seguido de la secuenciación de los insertos del vector (fragmentos de gen de alfa de TCR o beta de TCR). Los resultados de la secuenciación de cada colonia bacteriana se pueden analizar, por ejemplo, utilizando IMGTV-Quest. Las frecuencias de las cadenas alfa de TCR alfa o beta de TCR idénticas reflejan la proporción de clonotipos de células T idénticas dentro de la muestra de células T clasificada. Otra estrategia para analizar las secuencias de genes de alfa de TCR y beta de TCR de células T clasificadas es el uso de enfoques de secuenciación de próxima generación. Por ejemplo, los productos de PCR de los genes de alfa de TCR y beta de TCR, que se ligaron en vectores de secuenciación, se pueden transformar en bacterias y crecer en matraces que contienen medio selectivo y seguido de la preparación del ADN del vector. Las preparaciones de ADN del vector pueden usarse directamente para el análisis de secuenciación de próxima generación. Se considera que la frecuencia de vectores que contienen genes de alfa de TCR o beta de TCR idénticos es representativa de la cantidad inicial de células T del mismo clonotipo dentro de la muestra de células T clasificadas. La coincidencia de frecuencia de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR dentro de una muestra de células T se puede utilizar para analizar el emparejamiento de TCR funcionales (38), por ejemplo, los TCR que representaban la liberación de IFN γ específica de antígeno-MHC y la regulación por incremento de CD137. La sensibilidad de estos procedimientos permite el análisis detallado de los repertorios de TCR dentro de las muestras de células T. La coincidencia de las frecuencias de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR también permite la reconstitución de abundantes pares de cadenas de TCR de muestras de células T, lo que hace sea un cultivo de clones de células T intensivos de recursos prescindible. El cultivo a largo plazo es necesario para expandir los clones de células T en el cultivo, lo que solo puede favorecer el crecimiento de células T, que tenían un fenotipo de memoria central u original, por lo tanto, excluyen las células T del análisis, que tienen una capacidad de crecimiento limitada *in vitro*. Por lo tanto, para el análisis de los repertorios de TCR es una ventaja cribar y clasificar las respuestas de células T específicas de antígeno-MHC después de solo 14 a 28 días de enriquecimiento específico de antígeno.

[0037] Por lo tanto, preferiblemente, si después del análisis de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas alfa de TCR y beta de TCR de la población seleccionada de células T, se identifica más de una cadena alfa de TCR y cadena beta de TCR, se analiza la frecuencia de las cadenas alfa de TCR y cadenas beta de TCR en la población y las cadenas alfa de TCR alfa y beta de TCR que constituyen un TCR capaz de reconocer el epítipo se emparejan en función de su frecuencia. Alternativamente, puede llevarse a cabo un análisis adicional, por ejemplo, la generación de células T que llevan combinaciones de diferentes cadenas alfa de TCR y beta de TCR beta predominantes, y el análisis de su activación por células de la biblioteca utilizadas en la etapa b.

[0038] Las cadenas alfa y beta de TCR se pueden modificar, lo que lleva a construcciones de cadena alfa de TCR (TRA) y construcciones de cadena beta de TCR (TRB) de la invención. Opcionalmente, el uso de codones de TRA y TRB puede optimizarse para mejorar la expresión del TCR en células T recombinantes. Además, las regiones variables humanas pueden combinarse con regiones constantes murinas (39), o una región constante murina mínima, es decir, regiones constantes humanas que contienen solo aminoácidos definidos de la región constante murina (40) y que además comprenden un puente de cisteína adicional (41, 42), que aumenta la unión preferencial de las cadenas de TCR transgénicas entre sí y reduce el emparejamiento con las cadenas de TCR endógenas expresadas por células T receptoras.

[0039] Además la optimización de la expresión es posible, por ejemplo, mediante la generación de construcciones de TCR de una sola cadena que alberga las regiones variables de las TRA y TRB para evitar el emparejamiento de cadenas de TCR endógenas con cadenas introducidas y para mejorar la actividad funcional. Además, pueden generarse moléculas receptoras solubles y proteínas de fusión que contienen las regiones variables de los genes de las cadenas TRA y TRB y, por ejemplo, dominios de anticuerpos.

[0040] Las células T específicas para un epítipo de un antígeno definido presentado en un MHC pueden generarse expresando los ácidos nucleicos que codifican las TRA y TRB. Si tales células T están destinadas a la terapia de un paciente, se prefiere usar células T autólogas. Alternativamente, es posible un entorno alogénico utilizando supresión inmunitaria.

[0041] Los análisis de la activación de células T transfectadas con construcciones de TCR adecuadas con células de la biblioteca que expresan alelos de MHC específicos se pueden usar fácilmente para analizar la restricción a MHC de TCR.

[0042] La presente invención proporciona además un procedimiento para la identificación de un epítipo de un antígeno definido capaz de ser presentado por una molécula de MHC, que comprende llevar a cabo las etapas a-d del procedimiento de la invención descrito anteriormente, e identificar el epítipo capaz de activar dichas células T seleccionadas o células T modificadas con ácidos nucleicos que codifican las TRA y TRB que constituyen la construcción de TCR. Las estrategias de mapeo de epítopos son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las células de la biblioteca que expresan el alelo de MHC relevante pueden transfectarse con minigenes que cubren secciones del antígeno relevante, y se pueden analizar las respuestas, por ejemplo, secreción de IFN γ , para encontrar la sección que alberga el epítipo. La pulsación de péptidos con péptidos externos también puede ser útil. La predicción de epítopos puede emplearse como parte de dicha estrategia, pero es importante tener en cuenta que, tal como se muestra en los experimentos descritos a continuación, la especificidad de TCR no necesariamente coincide con los datos pronosticados a partir de los algoritmos de predicción de epítopos.

[0043] Además, el epítipo identificado para inducir respuestas de células T específicas de antígeno, que se demuestra por el aislamiento de los TCR específicos de antígeno que representan esta respuesta, se puede utilizar para desarrollar formulaciones de vacunas que contienen la secuencia de epítipo. El procedimiento descrito en las invenciones asegura el reconocimiento de epítopos en MHC, que son procesados de manera endógena y presentados por células que expresan un antígeno definido. La aplicación de la vacuna que contiene epítopos puede proporcionar inmunidad de células T a los pacientes para eliminar las células que expresan de forma natural el antígeno definido.

[0044] En resumen, el procedimiento de la invención tiene varias ventajas sobre los procedimientos convencionales de proporcionar construcciones de TCR que pueden usarse, por ejemplo, para la terapia adoptiva de células T. Por ejemplo, el repertorio completo de células T está cubierto, por ejemplo, incluyendo todos los elementos de restricción de MHC I similares de un donante determinado. El procedimiento también permite la detección de células T con la especificidad de antígeno deseada, pero no requiere conocimiento previo de epítopos. Se basa en el reconocimiento de epítopos procesados endógenamente y presentados sin predeterminación de epítopos seleccionados. Los diferentes epítopos de un antígeno tienen una jerarquía de expresión definida como dominancia inmunitaria. Las construcciones de TCR identificadas por el procedimiento de la invención reconocen los epítopos dominantes inmunitarios dentro de los antígenos diana, que se presentan de manera más eficiente en uno de los seis alelos de MHC I. El procedimiento también permite la identificación de células T que reconocen epítopos subdominantes del mismo antígeno. Finalmente, el procedimiento permite la detección paralela de clonotipos de células T diferentes que reconocen el mismo antígeno.

[0045] La invención también proporciona nuevas construcciones de TCR y los epítopos reconocidos por estas construcciones de TCR, que son obtenibles mediante el procedimiento de la invención y se describe a continuación, así como ácidos nucleicos, por ejemplo, vectores, tales como vectores de expresión, que codifican estas construcciones de TCR o las respectivas TRA y TRB o fragmentos de las mismas, tales como fragmentos variables o la región CDR3 de las TRA o TRB, o células T transgénicas que expresan dichos ácidos nucleicos.

[0046] La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la causa principal del desarrollo de cánceres de cuello uterino, anogenitales y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (43,44). Los tipos oncogénicos de VPH representan aproximadamente 610.000 casos de cáncer por año en todo el mundo.

[0047] El tipo oncogénico más prevalente es VPH16 que representa más del 50% de los casos de cáncer de cuello uterino. E6 y E7 de VPH16 tienen potencial de transformación y se consideran oncogenes impulsores (45,46). Se ha demostrado que E5 de VPH16 tiene potencial oncogénico, debido a su capacidad para transformar fibroblastos *in vitro* (47,48). Además, se encontró que E5 se expresa en biopsias de cáncer de cuello uterino invasivo, lo que indica un papel importante de E5 en el inicio y mantenimiento del fenotipo transformado de los queratinocitos malignos (49-51).

[0048] Aunque los programas de vacunación profiláctica junto con exámenes médicos e intervenciones reducirán la morbilidad relacionada con VPH en varios países durante los próximos siglos, el VPH seguirá siendo un problema de salud global significativo con una necesidad de tratamientos terapéuticos del cáncer de cuello uterino y otros cánceres causados por VPH.

[0049] Los intentos de tratamiento terapéutico de tumores malignos asociados al VPH se han descrito en numerosos estudios. Sin embargo, solo un estudio de fase I/II que aplica péptidos largos sintéticos que cubren la secuencia completa de E6 y E7 de VPH16 ha mostrado datos de pacientes que experimentaron una regresión de neoplasias intraepiteliales vulvares (VIN) de alto grado en más del 50% de los pacientes. Esta respuesta se asoció con respuestas de células T específicas de VPH (52). Sin embargo, faltan resultados comparables dirigidos a las lesiones de CIN y el cáncer de cuello uterino, lo que sugiere que los intentos actuales de vacunación terapéutica

dirigida a E6 y E7 de VPH16 no superan los mecanismos de escape inmunitario del VPH (52,53). Además, faltan TCR potentes dirigidos a E6 y E7 que permitan la validación del tratamiento inmunoterapéutico de tumores malignos inducidos por el VPH.

5 **[0050]** Como se buscan nuevas estrategias terapéuticas para tratar cánceres inducidos por VPH, los esfuerzos de los inventores se concentraron en el aislamiento de TCR específicos de antígeno para los antígenos derivados de VPH y la identificación de epítomos inmunogénicos de estos antígenos utilizando el procedimiento descrito anteriormente. E5, E6, E7 y L1 de VPH16 se usaron como antígenos.

10 **[0051]** El citomegalovirus (CMV), también designado virus del herpes humano 5 (HHV-5), es un miembro de la familia del virus del herpes. Las infecciones por CMV se parecen a otras infecciones por el virus del herpes, ya que están controladas por las células T CD8⁺ y CD4⁺, que aparecen con una frecuencia precursora muy alta en individuos seropositivos del CMV (54). La infección por CMV suele ser asintomática en individuos inmunocompetentes y persiste durante toda la vida en una etapa latente en hasta el 90% de la población. La enfermedad por CMV puede manifestarse en algunas personas inmunocomprometidas después del nacimiento o después del trasplante de células madre hematopoyéticas o del trasplante de órganos sólidos, lo que causa un total de 5.600 casos de enfermedad grave con 560 muertes por año en los EE. UU. (54). El CMV ha sido ampliamente considerado como no oncogénico, ya que la infección no parece conducir a la transformación celular, pero puede infectar de manera oportunista las células malignas. Estudios recientes han asociado el CMV con el glioblastoma, cuestionando que el CMV es un virus no oncogénico (55-58). A la luz de esto, los inventores han decidido investigar también TCR específicos para antígenos de CMV.

20 **[0052]** Se observó una respuesta fuerte de células T a E5 de VPH16 en combinación con HLA-B*15:01 tras el cribado con células K562 que expresaban antígeno de la biblioteca de células MHC. Además, se observó una respuesta de células T específicas de pp65 de CMV sobre HLA-B*07:02. Las muestras de células T que respondieron a una combinación de antígeno-MHC se clasificaron directamente y se analizaron para determinar las secuencias del gen del TCR. Los genes predominantes del TCR en una muestra se clonaron en un vector de expresión retroviral y se evaluaron ensayos mediante la transducción de diferentes combinaciones de cadenas alfa y beta de TCR en PBMC. Se pudo reconstituir un TCR funcional específico de E5 de VPH16 y un TCR funcional específico de pp65 de CMV, que reconocieron epítomos procesados endógenamente presentados en HLA-B*15:01 y B*07:02, respectivamente.

25 **[0053]** En particular, de este modo, la presente invención proporciona una construcción de TCR específica de E5 de VPH, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 7, que se puede usar, por ejemplo, para terapia génica con TCR para tratar la infección por VPH, en particular, tumores malignos inducidos por VPH. La invención proporciona un ácido nucleico que codifica una TRA y/o TRB de una construcción de TCR específica para un epítomo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 en complejo con un MHC I humano, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 7. El ácido nucleico puede obtenerse u se obtiene del procedimiento de la invención descrito en este documento.

30 **[0054]** Los inventores proporcionan una construcción de TCR específica para un epítomo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 en complejo con HLA-B*15:01, que comprende la SEQ ID NO: 1, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 7. La construcción de TCR preferiblemente también reconoce una versión más larga en N-terminal del epítomo, por ejemplo, puede consistir en SEQ ID NO: 1, 45, 47, 49, 51, 52 y 57. Los inventores mostraron que estos péptidos se procesan endógenamente y pueden presentarse en HLA-B*15:01, y por lo tanto pueden ser la diana del reconocimiento de TCR. Además de la terapia génica con TCR, las vacunas que comprenden péptidos de SEQ ID No: 1, 45, 47, 49, 51, 52 y 57 pueden ser una segunda estrategia para proporcionar inmunidad con células T en pacientes positivos de HLA-B*15:01. Aproximadamente el 12% de la población alemana tiene al menos un alelo HLA-B*15:01. Se ha encontrado que los estudios de población en China, Corea del Sur y Japón tienen frecuencias alélicas de B*15:01 aún más altas (59).

35 **[0055]** La especificidad de un TCR o una construcción de TCR se define principalmente por las regiones CDR3 del TCR. La construcción de TCR de la invención específica para el epítomo E5 presentado en HLA-B*15:01 comprende una TRA que comprende una CDR3 de SEQ ID NO: 2 o una CDR3 que tiene al menos un 84%, preferiblemente, al menos un 92% de identidad de secuencia con la misma, es decir, puede haber una o dos sustituciones, inserciones o deleciones. Si hay mutaciones, se prefieren las sustituciones conservadoras. La SEQ ID NO: 2 es una secuencia preferida de una CDR3 de una TRA de la invención. En una realización, la TRA comprende la CDR3 de SEQ ID NO: 2, la CDR1 de SEQ ID NO: 64 y la CDR2 de SEQ ID NO: 65.

40 **[0056]** La región variable de la TRA comprende preferiblemente la SEQ ID NO: 3 o tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente, al menos 90% o al menos 95% con la SEQ ID NO: 3, en la que, preferiblemente, la región variable comprende la SEQ ID NO: 2. La región variable puede estar codificada por un ácido nucleico de SEQ ID NO: 60. La TRA preferiblemente tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente, al menos 90%, al menos 95% o 100% con la SEQ ID NO: 4 o consiste en la misma, en la que la región constante es preferiblemente una región constante murina o una región constante murina mínima para mejorar el emparejamiento

de cadenas TCR transgénicas. Alternativamente, la región constante también puede ser humana, lo que minimiza el riesgo de reconocimiento inmunitario por parte de las células inmunitarias del receptor.

5 **[0057]** Un ácido nucleico optimizado en codones preferido que codifica la TRA de la construcción de TCR específica para el epítipo E5 de VPH de la invención es la SEQ ID N°: 5.

10 **[0058]** La construcción de TCR de la invención específica para el epítipo E5 presentado en HLA-B*15:01 comprende una TRB que comprende una CDR3 de SEQ ID NO: 6 o una CDR3 que tiene una o dos sustituciones conservadoras en SEQ ID NO: 6. La SEQ ID NO: 6 es una secuencia preferida de una CDR3 de una TRB de la invención. En una realización, la TRB comprende la CDR3 de SEQ ID NO: 6, CDR1 de SEQ ID NO: 66 y CDR2 de SEQ ID NO: 67.

15 **[0059]** La región variable de la TRB preferiblemente comprende SEQ ID NO: 7 o tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente, al menos 90% o al menos 95% con la SEQ ID NO: 7, en la que, preferiblemente, la región variable comprende la SEQ ID NO: 6. La región variable puede estar codificada por un ácido nucleico de SEQ ID NO: 61. La TRB preferiblemente tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente, al menos 90%, al menos 95% o 100% con la SEQ ID NO: 8 o consiste en la misma, en la que la región constante es preferiblemente una región constante murina o una región constante murina mínima para mejorar el emparejamiento de cadenas de TCR transgénicas. Alternativamente, la región constante también puede ser humana, lo que minimiza el riesgo de reconocimiento inmunitario. Un ácido nucleico optimizado en codones preferido que codifica la TRB es la SEQ ID NO: 9.

20 **[0060]** La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica tanto TRA como TRB específicas para el epítipo de E5 de VPH en un casete de expresión adecuado, por ejemplo, para la terapia génica con TCR para tratar las infecciones por VPH, en particular tumores malignos inducidos por VPH, por ejemplo, que comprende la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 40.

25 **[0061]** En base a las secuencias proporcionadas por el procedimiento de la invención, es posible llevar a cabo la maduración por afinidad de las secuencias de TCR (60,61). Las sustituciones de nucleótidos no sinónimos que conducen a intercambios de aminoácidos en la secuencia de CDR3 pueden conducir a una mayor afinidad del TCR por el antígeno diana. Además, los cambios de secuencia de TCR en otras partes de las regiones de TRA y TRB variables pueden cambiar, preferiblemente aumentar, la afinidad de la construcción de TCR al complejo pMHC. Se prefiere que las construcciones de TCR que varían de las secuencias específicas proporcionadas retengan una especificidad exclusiva para el antígeno siana proporcionado. Por consiguiente, se prefiere que la transferencia adoptiva de células T que expresan la construcción de TCR de la invención no tenga efectos negativos significativos sobre el tejido sano.

30 **[0062]** Los ácidos nucleicos de la invención pueden proporcionarse como vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la invención que codifican la TRA y/o TRB de la invención, por ejemplo, vectores en los que la TRA y/o TRB están unidas operativamente a un promotor adecuado para la expresión en células T, tales como las células T humanas. Preferiblemente, dicho promotor es un promotor heterólogo, es decir, no está unido a los genes de alfa o beta de TCR en células naturales, en particular, en células T humanas. El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible, preferiblemente un promotor del virus de sarcoma mieloproliferativo (MPSV), CMV, CAG o EF1α. Los ácidos nucleicos de la invención pueden proporcionarse como ARN, como vectores retrovirales, como vectores γ -retrovirales, como vectores lentivirales o como vectores basados en transposones. En una realización, el vector es adecuado para la terapia génica con TCR de un paciente humano. Preferiblemente, el vector es MP71. Los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, que codifican TRA y TRB, pueden fusionarse a través de un enlazador genético, preferiblemente un elemento 2A derivado de virus, para proporcionar un único cassette transgénico que codifica ambas cadenas de una construcción de TCR funcional.

35 **[0063]** La invención también proporciona proteínas codificadas por los ácidos nucleicos de la invención, o proteínas de fusión de los mismos, en particular TRA y/o TRB codificadas por los ácidos nucleicos de la invención y específicas para los antígenos descritos, por ejemplo, para el epítipo de la oncoproteína E5 de VPH16. Una TRA y/o TRB de la invención puede comprender todas las características o dominios correspondientes a su homólogo nativo, pero esto no es esencial. Preferiblemente, la TRA y la TRB comprenden al menos una región variable, o una región variable y constante, por ejemplo, la región variable y/o constante que tiene al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia con una región de TCR variable o constante humana. Para la terapia adoptiva de células T, se prefiere que la construcción de TCR sea un TCR que comprende cadenas alfa y beta de TCR de longitud completa que comprenden regiones variables, constantes y transmembrana.

40 **[0064]** La construcción también puede ser una proteína de fusión, por ejemplo, regiones variables de las cadenas de TCR pueden estar fusionadas a dominios de Ig, por ejemplo, un dominio constante de IgG, preferiblemente, dominios de anticuerpo anti-CD3 en una proteína de fusión de la invención, por ejemplo, para proporcionar reactivos de TCR monoclonales solubles para reconocer células malignas que expresan el pMHC respectivo en la superficie celular y se acoplan a las células T mediante, por ejemplo, un dominio de reconocimiento anti-CD3 para proporcionar funciones efectoras a las células diana (63).

- 5 **[0065]** Las construcciones de cadena única (scTCR) están abarcadas, así como construcciones de TCR heterodiméricas. Una scTCR puede comprender una región variable de una construcción de una primera cadena de TCR (por ejemplo, una cadena alfa) y una segunda cadena de TCR completa (de longitud completa) (por ejemplo, una cadena beta), o viceversa. Además, la scTCR puede comprender opcionalmente uno o más enlaces que unen los dos o más polipéptidos. El enlazador puede ser, por ejemplo, un péptido que une dos cadenas individuales, tal como se describe en el presente documento. También se proporciona dicha scTCR de la invención, que se fusiona con una citoquina, por ejemplo, una citoquina humana, tal como IL-2, IL-7 o IL-15.
- 10 **[0066]** La construcción de TCR de acuerdo con la invención también puede proporcionarse en forma de un complejo multimérico, que comprende al menos dos moléculas scTCR, en la que dichas moléculas scTCR están cada una fusionadas a al menos un resto de biotina, y en la que dichas scTCR están interconectadas por interacción biotina-estreptavidina para permitir la formación de dicho complejo multimérico. También se proporcionan complejos multiméricos de un orden superior, que comprenden más de dos, por ejemplo, cuatro, scTCR de la invención.
- 15 **[0067]** La construcción de TCR de la invención 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 picante) y partículas (por ejemplo, partículas de oro o partículas magnéticas).
- 20 **[0068]** La invención también se refiere a una célula huésped, preferiblemente, una célula T CD8⁺ que comprende un ácido nucleico que codifica la TRA y TRB de una construcción de TCR de la invención, a saber, una construcción de TCR específica para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 y que expresa dicha construcción de TCR. La TRA y el TRB se expresan preferiblemente a partir de un promotor heterólogo, por ejemplo, tal como se describió anteriormente. La célula T es preferiblemente una célula T humana. Puede aislarse de un paciente infectado con el virus relevante, en particular, un paciente que padece una neoplasia maligna asociada con dicho virus, tal como cáncer de cuello uterino, cáncer anogenital y cáncer de cabeza y cuello en el caso del VPH. El paciente expresa el MHC al que está restringido el epítipo reconocido por el TCR. La célula T puede ser una célula T de memoria central o una célula T original.
- 25 **[0069]** La invención también se refiere a dicha célula huésped, por ejemplo, célula T, o un ácido nucleico de la invención para usar en medicina, por ejemplo, en una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede usarse para el tratamiento de un paciente infectado con
 a) el virus del papiloma humano 16, en el que el TCR es específico para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 y en el que el paciente es positivo en HLA-B*15:01.
- 30 **[0070]** Para uso en medicina, se emplea la construcción de TCR que comprende tanto TRA como TRB, ya sea en forma de ácido nucleico, proteína o células T. Puede ser útil cribar los pacientes infectados con VPH para la expresión del antígeno de E5 antes de la terapia, y tratar solo aquellos pacientes con expresión de E5.
 La composición farmacéutica también puede ser para usar en la prevención de la infección o en la reducción de la infección con un virus del papiloma humano 16, en la que el TCR es específico para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 y en la que el paciente es positivo HLA-B*15:01.
- 35 **[0071]** Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas en las que el TCR es específico para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 y en las que el paciente es positivo en HLA-B*15:01 pueden utilizarse para la prevención del cáncer de cuello uterino en un paciente infectado con VPH16 por ejemplo, si se detectan lesiones premalignas de alto grado del cuello uterino.
- 40 **[0072]** La invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo (por ejemplo, infectado con VPH16, o que sufre de una enfermedad maligna asociada con dicho virus), o de reducción de la infección con el virus, o los síntomas de dicha infección, que comprende administrar a dicho paciente una célula T recombinante adecuada, o un ácido nucleico de la invención.
- 45 **[0073]** La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica un fragmento de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que comprende un epítipo, o un fragmento peptídico de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que comprende un epítipo, en el que el epítipo es capaz de ser reconocido por la construcción de TCR de la célula T de la invención, en el que el epítipo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No: 47, 51 y 52. Tales fragmentos de E5 pueden ser utilizados ventajosamente en la vacunación, por ejemplo, para la vacunación de péptidos largos sintéticos. Preferiblemente, el ácido nucleico codifica un epítipo, o el péptido consiste en un epítipo, que puede identificarse mediante el procedimiento de la invención para la identificación de un epítipo. Preferiblemente, el epítipo es un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 capaz de ser reconocido por la construcción TCR descrita anteriormente. El epítipo de E5, que se ha identificado por primera vez mediante el procedimiento de la invención, se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47 51 y 52.
- 50
55
60
65

[0074] La invención también se refiere a dicho ácido nucleico que codifica dicho fragmento de péptido E5 o dicho epítipo, o a dicho fragmento de péptido o epítipo para usar en medicina, preferiblemente, para prevenir la infección (o reducir la infección) con el virus del papiloma humano 16, para la prevención de cáncer de cuello uterino en una paciente infectado con VPH16, por ejemplo, si se detectan lesiones premalignas de alto grado del cuello uterino, o para el tratamiento de la infección por VPH16, en particular, un tumor maligno inducido por VPH16. Las vacunas que proporcionan dicho epítipo pueden administrarse a sujetos, por ejemplo, pacientes, que son positivos en HLA-B*15:01.

[0075] La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende

a) un ácido nucleico que codifica un fragmento de oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consiste en un epítipo o

b) un fragmento peptídico de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consiste en un epítipo

en la que el epítipo es capaz de ser reconocido por la construcción de TCR de la célula T de la invención, en la que el epítipo de E5 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 45, 47, 49, 51 y 52, para usar en prevenir la infección con el virus del papiloma humano 16 en un sujeto, o para usar en el tratamiento de un paciente infectado con el virus del papiloma humano 16, en el que el sujeto o paciente es positivo en HLA-B*15:01.

[0076] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ejemplificar la invención, y no limitar su alcance. Todas las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden combinarse.

Leyendas de las Figuras

[0077]

Figura 1. Vectores de HLA retrovirales. Esquema del vector γ -retroviral MP71 que contiene diferentes alelos de HLA fusionados a un marcador de expresión (a) IRES-GFP o (b) IRES-CFP.

Figura 2 Biblioteca de células de MHC de clase I. Las células K562 se transdujeron con el vector retroviral MP71 que incluyen un cassette (a) MHC-IRES-GFP o (b) MHC-IRES-CFP. Se muestra una selección de gráficos FACS de 10 transducciones de MHC que cubren todos los alelos de MHC de clase de dos donantes de células T. La expresión de GFP y CFP indica los índices de transducción. La expresión de superficie de MHC de células positivas para GFP o CFP se muestra mediante tinción de anticuerpos de MHC de clase I y se indica en porcentajes.

Figura 3 Ejemplos de expresión de antígeno estable en la biblioteca de células MHC. Las células K562 se transdujeron de manera estable con antígeno (E5 de VPH16) fusionado a un marcador IRES-mCherry y se detectaron mediante citometría de flujo midiendo la expresión de mCherry. Los alelos de MHC I se fusionan con el marcador IRES-GFP y la expresión se indica mediante detección por citometría de flujo de GFP. Los porcentajes de células dobles positivas a MHC-IRES-GFP/antígeno-IRES-mCherry se representan en los gráficos FACS. (a) Las células K562 de la biblioteca de células MHC se transdujeron de manera estable con E7. (b) Las células K562 transducidas con MHC (HLA-B*15:01) se transdujeron de manera estable con las construcciones de microgenes truncados de E5, que se usaron para el mapeo de epítipos (nt, nucleótidos).

Figura 4 Expresión de antígenos de ivtRNA en células diana. Las células K562 transducidas con MHC individuales que expresan el marcador IRES-CFP se transfectaron mediante electroporación con ivtRNA que codifica GFP. La expresión de GFP se midió 5 h después de la electroporación y sirvió como control para la eficacia de la transfección.

Figura 5 Inducción de la respuesta de células T específicas de antígeno tras el cocultivo con células K562 de la biblioteca de células MHC. (a) TCR-B23 y (b) TCR-S51 se transdujeron de forma estable en células T, que se tiñeron para expresión de CD8 y TRB transgénica y se analizaron por citometría de flujo. (c) Las células T transducidas con TCR se cocultivaron con células diana K562-B*27:05 3 h después de la transfección con ivtARN coE5. La expresión de CD137 se midió por citometría de flujo. Las células diana K562-B*27:05 transfectadas con H₂O sirvieron como control negativo.

Figura 6 mDC expresan GFP de ivtARN. Se generaron mDC a partir de monocitos adherentes a la placa. (a) Los histogramas de citometría de flujo muestran mDC que expresan las moléculas de activación de células T CD80, CD83 y CD86 (líneas negras) en comparación con los controles de isotipo (áreas grises). (b) Cuatro a seis horas después de la transfección con 15 μ g de ivtARN de antígeno, se midió la expresión de GFP. Se indican los porcentajes de DC GFP⁺.

Figura 7 Cribado de células T específicas de virus. Las células T, que habían sido estimuladas específicamente de antígeno con mDC autólogas, se cultivaron conjuntamente con células K562 que expresan seis MHC I individuales correspondientes de la biblioteca de células MHC. (a) El sobrenadante del cocultivo se analizó para la liberación de IFN γ con ELISA. (b) Las células del mismo pocillo se analizaron por citometría de flujo para determinar los porcentajes de células T CD137⁺ de CD8⁺.

Figura 8 Clasificación por FACS de células T específicas de virus. (a) Las células T, que mostraron reactividad a pp65 (Fig. 7b), se cocultivaron con células K562 que expresaban HLA-B*07:02 transfectadas con pp65 de la biblioteca de células MHC. (b) Las células T reactivas con E5 (Fig. 7b) se cultivaron conjuntamente con células K562 que expresaban HLA-B*15:01 transfectadas con E5 de la biblioteca de células MHC. Los linfocitos individuales de ambos cocultivos se controlaron en FSC/SSC y las células que expresan CD137 de las células CD8⁺ se clasificaron mediante FACS para su posterior análisis de TCR.

Figura 9 Expresión y análisis funcional de combinaciones de cadenas alfa de TCR y beta de TCR. (a) Las combinaciones de cadenas alfa de TCR y beta de TCR se expresaron retroviralmente en PBMC de donantes sanos. La expresión de TCR transgénica en células T se midió mediante citometría de flujo después de la tinción de anticuerpos para CD8 y el segmento de cadena beta de TCR constante murino. Las células T no transducidas (ut) se usaron como control negativo. El resultado es representativo de dos experimentos independientes con diferentes donantes de PBMC. (b) Las células T transducidas con las diferentes combinaciones de cadenas alfa de TCR y beta de TCR se cocultivaron con células diana K562-B*15:01 y K562-B*07:02 transfectadas con antígeno (E5 de VPH16 o pp65 de CMV), respectivamente. La liberación de IFN γ de las células T transducidas con alfa de TCR/beta de TCR se midió mediante ELISA. Los resultados se muestran como media +/- SEM de duplicados.

Figura 10. Generación de PBMC modificadas con gen de TCR con casetes transgénicos de TCR optimizados. Se realizó la transducción retroviral de PBMC con casetes transgénicos de TCR. Los índices de transducción se evaluaron mediante la tinción de anticuerpos del TRBC murino seguido del análisis de citometría de flujo. Los resultados son representativos de los experimentos con PBMC de dos donantes diferentes (ut, PBMC no transducidas).

Figura 11 Mapeo de la secuencia antigénica de E5 de VPH16 (a) E5 de tipo salvaje de longitud completa (wt) (252 nt), versión de E5 optimizado en codones (co) (252 nt) y versiones de minigenes truncados en 3' (63-189 nt) de E5wt se fusionaron con un marcador IRES-mCherry, se clonaron en el vector retroviral MP71 y se expresaron en células diana K562-B*15:01. Se indica la longitud de las secuencias de genes que comienzan con A del codón de inicio ATG. (b) Las células T transducidas con E5 de TCR se cultivaron conjuntamente durante 18 h con células diana K562-B*15:01 que portaban una de las versiones del gen de E5. La liberación de IFN γ se determinó por ELISA. Los resultados se muestran como media +/- SEM de duplicados.

Figura 12 Mapeo de epítomos del TCR específico de E5 de VPH16 y el TCR específico de pp65 de CMV. (a) Los epítomos de E5 de VPH16 predichos por IEDB como epítomos potenciales presentados en HLA-B*15:01 se agruparon de acuerdo con las similitudes de secuencia. La primera fila (p4-p17) (SEQ ID NOs: 1, 49-61) indica el rango de péptidos en la predicción de epítomos (**Tabla 2**). La segunda fila (unidades) la longitud del péptido. (b) Las PBMC transducidas con E5 de TCR se cocultivaron con células diana K562-B*15:01 pulsadas con péptido y se determinó la liberación de IFN γ por ELISA. Las células T no transducidas (ut) se usaron como control negativo. (c) El péptido p1 de pp65 de CMV (SEQ ID NO: 10) representa un epítomo previamente descrito de pp65 presentado en HLA-B*07:02 (66,67). (d) PMBCs transducidas con TCR pp65 se cocultivaron con células diana K562-B*07:02 pulsadas con p1 de pp65. La liberación de IFN γ se midió por ELISA. Todos los resultados de ELISA se muestran como media +/- SEM de duplicados.

Ejemplos

1.1 Generación de una biblioteca de vectores de MHC

[0078] Los genes para los alelos de MHC I comunes se clonaron en el vector γ -retroviral MP71 (68-70) para generar primero una biblioteca de vectores de MHC, para generar células K562 que expresan MHC individuales (23), que se usaron como APC artificiales que comprenden la biblioteca de células de MHC. Las versiones alélicas de los genes de HLA-A, -B o -C son altamente polimórficas. Las secuencias son de acceso abierto en la base de datos de IMGT/HLA. Sin embargo, los extremos 5' y 3' de diferentes tipos tienen altas similitudes de secuencia, lo que dificulta la amplificación por PCR de un gen de HLA específico de un ADNc de una célula. Para superar este problema, se generó ADNc a partir de células linfoblastoides (LCL) obtenidas del International Histocompatibility Workshop, que eran homocigotas para los alelos HLA-A, -B y -C deseados para permitir la amplificación eficiente de genes por PCR. Los fragmentos de HLA amplificados se fusionaron con un marcador de expresión IRES-GFP o IRES-CFP y se clonaron en el vector de expresión retroviral MP71 (**Fig. 1**).

1.2 Generación de la biblioteca de células de MHC

[0079] La línea celular K562 eritroleucémica (20) se utilizó como andamio de APC artificial para la generación de la biblioteca de células de MHC. Las células K562 carecen de expresión endógena de moléculas de MHC de clase I aunque expresan microglobulina β -2, un componente ubicuo de los complejos de MHC funcionales. Sin embargo, tras la transfección con un alelo de cadena α de MHC de clase I, se puede demostrar que las células poseen una maquinaria de procesamiento de antígeno funcional con expresión de superficie de MHC, lo que convierte a K562 en un andamio atractivo para la generación de APC artificiales (19, 23, 24). La transducción estable de células K562 con alelos de HLA individuales se realizó usando la biblioteca de HLA basada en el vector retroviral MP71. La producción de sobrenadante retroviral en células de empaquetamiento 293T y la transducción se realizaron, tal como se ha descrito (72), y dieron como resultado poblaciones que expresan GFP o CFP, tal como se confirmó mediante análisis de citometría de flujo. El ensamblaje funcional y la expresión en superficie de los complejos de MHC se indicaron mediante la tinción de anticuerpos para MHC de clase I de poblaciones de células positivas para GFP o CFP (**Fig. 2**). Todos los alelos de HLA transducidos en células K562 se expresaron en la superficie celular. Para un análisis posterior de los TCR aislados, se generaron paneles de células K562 que cubren los seis alelos de MHC de clase I del donante de células T original.

1.3 Expresión de antígeno en la biblioteca de células de MHC

[0080] Para usar células K562 de la biblioteca de células MHC como APCs artificiales, se transdujeron células K562 que expresaban células de MHC individuales con el vector retroviral MP71 para expresar de manera estable las construcciones antigénicas en el contexto de un único alelo de MHC. La transducción retroviral se realizó, tal como se ha descrito (71). La expresión de antígeno en células K562 permitió el procesamiento endógeno y la presentación de epítomos en el contexto de alelos de MHC individuales. Muchos antígenos (E5, E6 y L1 de VPH16, pp65 e IE-1 de CMV) no pudieron detectarse fácilmente mediante tinción intracelular con FACS. Además, los anticuerpos no estaban disponibles para los antígenos truncados de E5 de VPH16 (construcciones de minigenes), que se utilizaron para el mapeo de epítomos, así como las secuencias de nucleótidos mutadas. Por lo tanto, todos los antígenos se fusionaron con un marcador IRES-mCherry para confirmar indirectamente la expresión por citometría de flujo (**Fig. 3**).

[0081] Una segunda estrategia para expresar secuencias antigénicas en células diana fue transfectar ivtARN mediante electroporación. Por lo tanto, las secuencias de antígeno se clonaron en vectores de expresión para permitir la generación de ivtARN dependiente del promotor T7 y la posterior poliadenilación usando kits de mMessage mMachine y poli (A) de Ambion (Life Technologies). La electroporación de ivtARN en células K562 se realizó con un BioPad GenePulser usando un protocolo de electroporación exponencial. En general, se usó ivtARN que codifica GFP como control para la eficiencia de la electroporación. La **figura 4** muestra que las células K562 transducidas con HLA expresaron GFP después de la electroporación con ARNt ivt.

1.4 Inducción de la respuesta de células T específicas de antígeno por células diana de la biblioteca de células de MHC

[0082] En los experimentos anteriores, se demostró que el células K562 transducidas con HLA de la biblioteca de células MHC expresan un antígeno definido después de la transducción retroviral o después de la transfección con el ivtARN de antígeno. El siguiente paso fue probar la capacidad de la biblioteca de células de MHC para procesar endógenamente y presentar epítomos para inducir respuestas de células T específicas de antígeno. Se ha descrito que la estimulación específica de antígeno HLA de las células T a través del TCR conduce a la regulación por incremento del marcador de activación temprana CD137 (32-34).

[0083] Para esto, se utilizaron dos TCR bien caracterizados (B23, S51), que se aislaron de clones de células T específicas de antígeno, que reconocían un epítomo endógenamente procesado y presentado en HLA-B*27:05. Las PBMC diseñadas para expresar los TCR (**Fig. 5a, b**) se usaron para analizar la capacidad de células K562 que expresaban el antígeno de la biblioteca de células de MHC para activar las células T específicas de antígeno. La activación de las células T se midió mediante la expresión de CD137 mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la **Fig. 5c**, todas las PBMC modificadas con TCR expresaron el marcador de activación CD137 después de 20 h de cocultivo con células diana K562-B*27:05 transfectadas con ivtARN de antígeno. La cantidad de células T CD8⁺/CD137⁺ fue de alrededor del 6% para las células T modificadas con TCR-B23 y del 8% para las células T modificadas con TCR-S51, lo que refleja la cantidad total de células T modificadas con TCR/CD8⁺ (**Fig. 5a, b**) utilizadas para el cocultivo. En conclusión, las células K562 procesaron endógenamente el epítomo antigénico y lo presentaron en HLA-B*27:05 transgénico, lo que condujo a la estimulación de todas las células T específicas de antígeno en la muestra, medida por la expresión de CD137. Además, la expresión de CD137 se correlacionó con la liberación de IFN γ específica de antígeno de células T transducidas con TCR, medida por ELISA.

2.1 Expansión específica de antígeno de células T

[0084] A continuación, se describe la configuración de una estrategia de cribado para detectar y aislar los TCR con especificidad de antígeno deseada. Se puede transferir a diferentes antígenos, por ejemplo, de diferentes virus o diferentes antígenos específicos de tumor.

[0085] Por lo tanto, se generaron DC y se maduraron a partir de monocitos adherentes a placa (72,73) utilizando un medio libre de endotoxina. El estado de maduración de las DC maduras (mDC) se confirmó mediante la tinción de los marcadores de activación de células T CD80, CD83 y CD86, así como la expresión de MHC II, seguida de citometría de flujo (**Fig. 6**). El ivtARN de antígeno se generó a partir de seis antígenos virales (pp65 e IE1 de CMV, L1, E5, E6 y E7 de VPH16), que representaban secuencias de genes de tipo salvaje de referencia de longitud completa de VPH16 y CMV, tal como se indica en la base de datos UniProt de acceso abierto. Las mDC se transfectaron con ivtARN de antígeno para asegurar la presentación de epítomos procesados y presentados de forma natural en la superficie celular (74). Se usó ivtARN que codifica GFP como control de transfección. La expresión se midió 4-6 h después de la transfección (**Fig. 6**). Las mDC que expresan antígeno se usaron en una relación PBMC a DC de 10:1. La estimulación de PBMC con DC se realizó usando un medio que contenía suero humano al 10% (74,75). IL-2 (20 U/ml) e IL-7 (5 ng/ml) recibieron el medio a partir del día 2 de estimulación para favorecer la proliferación de células T. Tres veces a la semana se proporcionó IL-2 (20 U/ml) e IL-7 (5 ng/ml) al cultivo. Las PBMC proliferantes se dividieron en proporciones de 1:2 a 3:4.

2.2 Detección de células T específicas de virus

[0086] Se llevó a cabo una segunda estimulación 14 días después de la primera ronda de estimulación usando mDCs autólogas que expresan uno de los seis antígenos virales. Después de 28 días, los 12 cultivos de células T se cribaron para determinar la reactividad a combinaciones específicas de antígeno-MHC empleando la biblioteca de células de MHC (**Fig. 2**). Las células de la biblioteca de células de MHC se transfectaron con ivtARN de antígeno mediante electroporación y cada cultivo de células T generado contra un antígeno se cribó para determinar la reactividad al antígeno en combinación con un tipo de MHC. El contacto de la biblioteca con las células T se realizó preferiblemente 18-22 h para lograr la activación óptima de las células T específicas de antígeno dentro de la muestra de células T. Se evitó la adición de citoquinas durante el contacto para evitar la activación inespecífica de las células T. La liberación de IFN γ de células T específicas de antígeno se midió mediante ELISA. Además, las células T en el cocultivo se analizaron para la expresión de CD137 mediante citometría de flujo (33).

[0087] Las células T mostraron reactividad específica a pp65 y E5 en combinación con HLA-B*7:02 y HLA-B*15:01, respectivamente. La reactividad de células T específicas de antígeno-MHC podría medirse mediante la liberación de IFN γ y la regulación por incremento de CD137 en la superficie de las células T. Por lo tanto, la combinación de ELISA de liberación de citoquinas y el análisis citométrico de flujo del marcador de activación de células T representa un sistema robusto de lectura de dos procedimientos para detectar respuestas de células T específicas de antígeno-MHC.

2.3 Clasificación de células T específicas de virus para analizar el repertorio de TCR

[0088] Las células T, que mostraron respuestas específicas a una combinación de antígeno-MHC en ambos ensayos, se seleccionaron para la clasificación FACS para analizar el repertorio de TCR. Las células T, que se expandieron con pp65 de CMV, se cultivaron conjuntamente con células diana K562-B*07:02 transfectadas con pp65, y las células T CD137⁺ se separaron del cultivo. Casi la mitad de las células T CD8⁺ eran CD137⁺ en esta configuración. El trece por ciento de las células T CD8⁺ expresó CD137 tras el cocultivo con células diana K562-B*15:01 transfectadas con E5 de VPH16.

[0089] Después de la clasificación de las células T específicas de antígeno-MHC, se aisló ARN y se generó ADNc usando el kit de amplificación de SMARTer RACE cDNA (Clontech) para la PCR 5'-RACE de los genes de alfa y beta de TCR. La amplificación por PCR generó fragmentos de genes de alfa y beta de TCR, que representaban cuantitativamente la cantidad de cada clonotipo de células T en la muestra de células T clasificada por FACS. Los productos de PCR de fragmentos de genes de alfa y beta de TCR se ligaron en vectores de secuenciación usando el sistema de clonación TOPO® (Invitrogen, Life Technologies), se transformaron en bacterias y se cultivaron en placas que contenían medio selectivo. Se consideró que cada colonia bacteriana contenía un vector de secuenciación con un fragmento del gen de alfa o beta de TCR de la PCR. Las preparaciones de ADN de vector de numerosas colonias bacterianas fueron seguidas por la secuenciación de los insertos del vector (fragmentos de gen de alfa o beta de TCR). Los resultados de la secuenciación de cada colonia bacteriana se analizaron utilizando el IMGTV-Quest basado en la web. Las frecuencias de cadenas alfa o beta de TCR idénticas reflejaron la proporción de clonotipos de células T idénticos dentro de la muestra de células T clasificada por FACS. A continuación, se realizó la coincidencia de frecuencia de las cadenas alfa y beta de TCR para reconstituir los TCR funcionales, que habían representado la liberación de IFN γ específica de antígeno-MHC y la regulación por incremento de CD137.

[0090] El análisis de TCR reveló que las cadenas TRAV17 y TRAV38-2 estaban presentes en casi el 40% de todas las células T clasificadas tras la respuesta a E5 de VPH16 y HLA-B * 15:01. Se encontró que tres cadenas variables beta de TCR estaban presentes en el 21-32% de las células T (**Tabla 1**). Se supuso que cada una de las dos cadenas alfa de TCR podría ensamblar un TCR funcional específico de E5 con una de las tres cadenas beta de TCR. Por lo tanto, había seis combinaciones posibles de cadenas alfa de TCR y beta de TCR candidatas para ensamblar un TCR funcional específico para E5 de VPH16.

[0091] Las células T clasificadas para reactividad a pp65 de CMV y HLA-B*7:02 tenía un TCR predominante con una cadena TRAV17 y una cadena TRBV7-9, estando ambas presentes en aproximadamente el 70% de las colonias de alfa de TCR y beta de TCR, respectivamente (**Tabla 1**).

[0092] En resumen, el análisis de TCR mostró que la clasificación de CD137 de las células T específicas de antígeno-MHC está acompañado por un fuerte enriquecimiento de algunas cadenas alfa y beta de TCR predominantes, que aparecen a alta frecuencia y que puede reconstituir TCR específicos de antígeno-MHC funcionales.

Tabla 1 Análisis de TCR

MHC clase I	Segmento V	CDR-3	SEQ ID NO:	Frecuencia	% del total
Antígeno VPH16E5					
HLA-B*15:01	TRAV17*01 F	CAESEYGNKLVF	2	10	38,5
	homsap. TRAV38-	CAYRSWNYQNFVF	19	10	38,5

2/DV8*01 F homsap.					
TRAV8-6*02 F homsap.	CAVSEPAAGNKLTF	20	2	7,7	
TRAV26-2*01 F homsap.	CILRGAGGTSYGKLTFF	21	1	3,8	
TRAV8-6*02 F homsap.	CAVITNAGKSTF	22	1	3,8	
TRAV25*01 F homsap.	CAGPPSGTYKYIF	23	1	3,8	
TRAV6*02 (F) homsap.	CALPMEYGNKLVF	24	1	3,8	
TRBV5-1*01 F homsap.	CASSSRGHQNTGELFF	25	6	21,4	
TRBV12-3*01 F homsap.	CASSPEGEGVTGELFF	26	8	28,6	
TRBV6-5*01 F homsap.	CASSYRQQTQYF	6	9	32,1	
TRBV5-1*01 F homsap.	CASTLRGYTEAFF	27	1	3,6	
TRBV5-5*02 (F) homsap.	CASSPWADSNQPQHF	28	1	3,6	
TRBV20-1*01 F homsap.	CSAGTSGGPAYEQYF	29	1	3,6	
TRBV27*01 F homsap.	CASSSPLADDYNEQFF	30	1	3,6	
TRBV6-2*01 F ... homsap.	CASSHRRRAHRAREQYF	31	1	3,6	

Antígeno VPH16E5

HLA-B*07:02	TRAV14/DV4*01 F homsap.	CAMREGKDSSYKLIF	32	2	8,7
	TRAV17*01 F homsap.	CATVIRMDSSYKLIF	11	17	73,9
	TRAV8-1*01 F homsap.	CAVNRGGSNYKLTF	33	1	4,3
	TRAV3*01 F homsap.	CAVRDIGGFKTIF	34	1	4,3
	TRAV1-2*01 F homsap.	CALDGQKLLF	35	1	4,3
	TRAV4*01 F homsap.	CLVGGLRGNVLHC	36	1	4,3
	TRBV7-9*03 F homsap.	CASSLIGVSSYNEQFF	15	13	68,4
	TRBV27*01 F homsap.	CASRLGGGNYNEQFF	37	4	21,1
	TRBV20-1*01 F homsap.	CSASPRDRKFSGNTIYF	38	1	5,3
	TRBV7-9*03 F homsap.	CASSSHDNQGAKSPLHF	39	1	5,3

Las cadenas alfa y beta de TCR se amplificaron con cebadores inversos específicos de TRAC y TRBC de ADNc 5'-RACE de células T, que habían mostrado respuestas de células T específicas de antígeno-MHC. El análisis de TCR se realizó con IMGT/V-Quest. El uso del gen V(D)J y las secuencias CDR3 especifican cadenas alfa de TCR o beta de TCR idénticas. Se indican las frecuencias de colonias que contienen una cadena alfa de TCR o beta de TCR. El porcentaje del total indica la proporción de colonias con cadenas alfa de TCR o beta de TCR idénticas.

2.4 Análisis funcional de combinaciones de cadenas alfa de TCR y beta de TCR

5 **[0093]** Para la expresión transgénica de TCR, cada gen de la cadena alfa de TCR y beta de TCR se clonó en el vector γ -retroviral MP71. La expresión en la superficie celular y el análisis funcional de los TCR se realizaron después de la transducción estable de PBMC con diferentes combinaciones de genes de alfa de TCR y beta de TCR.

10 **[0094]** Las regiones variables de genes de cadena alfa de TCR y beta de TCR predominantes (TRAV y TRBV), que son responsables de la unión péptido-MHC (pMHC) I, se fusionaron a segmentos de genes de cadena alfa de TCR y beta de TCR constantes murinos optimizados en codones (mTRAC y mTRBC) para permitir el emparejamiento

preferencial de cadenas de TCR transgénicas después de la transducción retroviral de células T (39, 40, 71). La tinción de los TCR transgénicos con un anticuerpo específico para el mTRBC fue seguida por un análisis de citometría de flujo y mostró que todas las combinaciones de cadenas TRA/TRB se expresaron en PBMC (**Fig. 9a**). Sin embargo, los índices de transducción de diferentes combinaciones variaron entre 6-25%. Para el análisis funcional, se probó la reactividad de las células T transducidas con TCR a las células diana K562-B*15:01 o K562-B*07:02, que se transfectaron mediante electroporación con ivtARN de antígeno E5 de VPH16 o pp65 de CMV, respectivamente. Sorprendentemente, las células T que expresan TRAV17 (SEQ ID NO: 3) en combinación con TRBV6-5 (SEQ ID NO: 7) reconocieron las células diana transfectadas con E5, mientras que ninguna de las otras cinco combinaciones TRA/TRB mostró reactividad específica de antígeno a E5 (**Fig. 9b**). Por lo tanto, TRAV17 en combinación con TRBV6-5 reconstituyó un TCR específico de antígeno funcional. La única combinación candidata TRA/TRB de células T reactivas al CMV (TRAV17 (SEQ ID NO: 12) y TRBV7-9 (SEQ ID NO: 16)) mostró un reconocimiento específico de pp65 de las células diana K562-B*07:02. Las células T transducidas por TRA/TRB no mostraron reactividad de fondo a células diana transfectadas con H₂O (**Fig. 9b**), permitiendo así la identificación clara de los TCR específicos de antígeno-MHC funcionales.

[0095] En conclusión, las reconstituciones de los TCR de clonotipos de células T específicas de antígeno se lograron a través de la combinación de cadenas TRA y TRB, que se encontraron en altas frecuencias en muestras de células T clasificadas por FACS. Este enfoque, que se basó en el uso de la biblioteca de células de MHC pudo lograr el cribado, detección y aislamiento de TCR con la especificidad de antígeno deseada.

2.5 Optimización de los TCR específicos de VPH y CMV para la expresión transgénica en PBMC

[0096] Para aumentar la eficiencia de la expresión de TCR transgénico, se aplicaron varias optimizaciones de secuencias transgénicas de TCR (71). Las secuencias de las cadenas TRA y TRB fueron optimizadas por codones y los segmentos de genes de TRAC y TRBC humanos fueron reemplazados por sus homólogos murinos para aumentar la unión preferencial de las cadenas de TCR transgénicas y reducir el emparejamiento con cadenas de TCR endógenas expresadas por las células T receptoras (SEQ ID NO: 5, 9, 14, 18). El gen de TRB optimizado se unió a continuación a través de un elemento P2A a los genes de TRA y los casetes transgénicos de TCR individuales resultantes (específicos de E5: SEQ ID NO: 40, específicos de pp65: SEQ ID NO: 41) se clonaron molecularmente en el vector γ -retroviral MP71. Las partículas retrovirales que incluían los casetes transgénicos de TCR optimizados se generaron mediante una transfección de tres plásmidos de células 293T y las PBMC de donantes se transdujeron de manera estable con partículas retrovirales que codificaban los TCR (70). Las células T modificadas con el gen de TCR dentro de la muestra de PBMC se analizaron por citometría de flujo después de la tinción de anticuerpos de la TRBC murina transgénica. Los índices de transducción de TCR del 45% para el TCR específico de E5 (TRAV17 + TRBV6-5, SEQ ID NO: 40) y el 37% para el TCR específico de pp65 (TRAV17 + TRBV7-9, SEQ ID NO: 41) pudieron lograrse en las PBMC, en las que el 27% y el 22%, respectivamente, fueron positivos para CD8 y el TCR transgénico. En conclusión, la expresión de TCR transgénico podría mejorarse notablemente del 6-7% cuando se usan los casetes transgénicos de cadena sencilla de TRA y TRB no optimizados, que se usaron para reconstituir los TCR funcionales, a aproximadamente el 40% cuando se usan los casetes transgénicos de TCR optimizados.

2.6 Mapeo de epítomos del TCR específico de E5 de VPH16

[0097] Después de la detección de clonotipos de células T que reconocen la combinación inmunogénica antígeno-MHC sin conocimiento previo de epítomos inmunogénicos, se realizó el mapeo de epítomos para revelar la secuencia peptídica exacta dentro de la proteína antigénica E5 de VPH16, que es reconocida por el TCR específico de E5. El TCR específico de E5 de VPH16 compuesto de las secuencias TRAV17 y TRBV6-5 era un TCR único, que no se ha descrito antes. Para mapear la secuencia antigénica reconocida por el TCR, se generaron versiones de minigenes truncados en 3' de E5 de VPH16 mediante PCR con cebadores que amplifican la región del gen de interés respectiva. Los minigenes de E5 se clonaron en el vector retroviral MP71 y se transdujeron de forma estable en células diana K562-B*15:01 (**Fig. 11a**). Las células T transducidas con el cassette del gen de TCR específico de E5 optimizado reconocieron las células diana que portaban la secuencia de minigenes de E5 de longitud completa y E5 de 189 nt, pero no minigenes de E5 de 126 y 63 nt, tal como se indica mediante la liberación de IFN γ (**Fig. 11b**). Además, las células T transducidas con TCR para E5 liberaron IFN γ independientemente de si las células objetivo albergaban secuencias de genes E5wt o E5co (**Fig. 11b**). En conclusión, el TCR para E5 de VPH16 fue específico para un epítomo dentro de la región de la proteína E5 entre los aminoácidos 42-63.

[0098] Para reducir los epítomos candidatos que pueden ser objeto de reconocimiento por TCR específico de E5, la predicción *in silico* de epítomos se realizó mediante el predictor combinado de epítomos de células T IEDB basado en la web, que integra las predicciones de la escisión proteasomal, transporte de TAP, procesamiento en ER y unión a MHC clase I. La predicción integrada de epítomos se realizó incluyendo péptidos de 8-14 unidades en un análisis. Los resultados de predicción de epítomos se calcularon como una puntuación total, que puede interpretarse como la probabilidad de que un péptido determinado sea procesado y presentado en una molécula de MHC en la superficie celular. La **Tabla 2** incluye todos los epítomos (p1-p17) de la predicción con una puntuación total positiva usando la predicción constitutiva del proteasoma. A diferencia de las DC, las células K562 expresan un proteasoma constitutivo, que se asemeja a los proteasomas expresados en las células tumorales (76). Todos los epítomos, que

no se expresaron a partir de la secuencia de aminoácidos 42-63 de E5 de VPH16, se excluyeron de un análisis adicional. Sorprendentemente, los tres primeros epítomos predichos (p1-p3) tuvieron que descartarse.

Tabla 2 Predicción de epítomos de E5 de VPH16

#	Posición	unidades	Secuencia	Afinidad a MHC [nM]	Puntuación total	SEQ ID NO
p1	28	12	LIRPLLLSVSTY	42,98	0,70	42
p2	27	13	LLIRPLLLSVSTY	39,49	0,67	43
p3	72	9	FLIHTHARF	32,60	0,60	44
p4	55	9	SAFRCFIVY	97,77	0,60	1
p5	54	10	ASAFRCFIVY	102,30	0,58	45
p6	48	10	LLWITAASAF	39,05	0,58	46
p7	51	13	ITAASAFRCFIVY	79,80	0,51	47
p8	32	8	LLLSVSTY	63,70	0,38	48
p9	53	11	AASAFRCFIVY	143,79	0,36	49
p10	55	14	SAFRCFIVYIIFVY	138,79	0,36	50
p11	50	14	WITAASAFRCFIVY	144,35	0,32	51
p12	52	12	TAASAFRCFIVY	149,57	0,28	52
p13	47	11	LLLWITAASAF	70,87	0,25	53
p14	11	9	LLACFLLCF	119,99	0,10	54
p15	50	8	WITAASAF	108,63	0,08	55
p16	73	8	LIHTHARF	116,82	0,05	56
p17	48	13	LLWITAASAFRCF	169,11	0,00	57

Se usó la predicción integrada de epítomos de MHC de clase I (IEDB) para catalogar la probabilidad de epítomos diana candidatos (p1-17) para el TCR específico de E5 de VPH16. Se representa la posición del primer aminoácido de los péptidos predichos dentro de la proteína E5 de VPH16 de longitud completa (Pos.), longitud del péptido (unidades), secuencia de aminoácidos, afinidad de unión pronosticada a HLA-B*15:01 y la SEQ ID NO. El algoritmo utiliza una puntuación total combinada (unidades arbitrarias), que integra predicciones para la escisión proteasómica, el transporte de TAP y la afinidad de unión a MHC (HLA-B*15:01). La tabla muestra solo péptidos con una puntuación total superior a cero. Cuanto mayor es la puntuación total, mayor es la eficiencia de un péptido para ser procesado y presentado en la superficie celular. Los epítomos en negrita se tradujeron de la secuencia de 126-189 nt de E5. Los epítomos en cursiva fueron reconocidos por el TCR

[0099] El resultado de la predicción integrada de epítomos de E5 de VPH16 se indica en la **Tabla 2**. El mejor epítomo predicho se clasificó en primer lugar. Los péptidos codificados dentro de la secuencia de aminoácidos 42-63 se muestran en negrita. Estos diez epítomos candidatos se agruparon de acuerdo con las similitudes de secuencia (**Fig. 12a**) y los péptidos se cargaron exógenamente en células diana K562-B*15:01. Las PBMC transducidas con TCR E5 reconocieron **específicamente** el epítomo p4 de E5 de VPH16 (SAFRCFIVY, SEQ ID NO: 1). Además, el TCR reconoció claramente todos los derivados alargados en N-terminal de SAFRCFIVY (SEQ ID NO: 1) incluyendo longitudes de péptidos no convencionales que confieren 12, 13 y 14 unidades para MHC I (**Fig. 12b**). HLA-B*15:01 puede tolerar la unión de péptidos que sobresalen en el extremo N-terminal. Por el contrario, ninguno de los otros péptidos fue reconocido, aunque se predijo que los péptidos p6 y p13 tenían mayores afinidades de unión a HLA-B*15:01 que p4.

[0100] En resumen, la predicción integrada de epítomos facilitó el mapeo del epítomo exacto reconocido por el TCR específico de E5. Sin embargo, el algoritmo no pudo predecir el epítomo inmunogénico, y fue necesario mapear la secuencia antigénica con minigenes truncados de E5 antes de la predicción del epítomo.

[0101] Las secuencias de TRAV17 y TRBV7-9 aisladas se parecían a un TCR específico de CMV. Las secuencias de TCR específicas para pp65 de CMV y restringidas a HLA-B*07:02 se han publicado con una diferencia de uno a cinco aminoácidos en las regiones CDR3 (66,67) (**Tabla 1**). Se ha descrito que estos TCR reconocían el epítomo de 10 unidades TPRVTGGGAM (SEQ ID NO: 10) de pp65 de CMV cuando se presentó en HLA-B*07:02. Aquí, las PBMC transducidas con TCR para pp65 se cocultivaron con células diana K562-B*07:02 cargadas con el epítomo p1 derivado de pp65 de CMV (TPRVTGGGAM, SEQ ID NO: 10) (**Fig. 12a**). De hecho, las células T transducidas con TCR reconocieron las células diana pulsadas con p1 y liberaron IFN γ (**Fig. 12b**). Las PBMC transducidas con TCR para pp65 fueron específicos para p1, a pesar de las diferencias de secuencia en la región CDR3 en comparación con los TCR específicos pp65-B*07:02 publicados previamente.

[0102] En resumen, este enfoque permitió la identificación de un nuevo epítomo inmunogénico E5 de VPH16 y su correspondiente TCR y de un epítomo inmunodominante pp65 de CMV y su correspondiente TCR. Ambos TCR fueron específicos para epítomos procesados endógenamente y reflejaron la respuesta de células T causada por un solo clonotipo de células T en el cribado inicial basado en la biblioteca de células MHC. Por lo tanto, es posible un cribado imparcial de las respuestas de células T naturales y la identificación de TCR rápidamente después de la estimulación *in vitro* específica de antígeno con el procedimiento de la invención, sin conocimiento previo del

epítopo, evitando así las limitaciones de los programas de predicción de epítopos para predecir respuestas de células T funcionales a un antígeno definido y evitando el cultivo de clones de células T desfavorables y que requieren muchos recursos. Este enfoque también se puede aplicar a TIL o células T residentes en tejidos y los cribados pueden extenderse a más antígenos derivados de patógenos y específicos de tumor, así como a cualquier antígeno que sea reconocido por un TCR.

Referencias

[0103]

1. Schumacher TNM. *Nat Rev Immunol*. 2002;2 (Julio):512-9.
2. Vonderheide RH, June CH. *Immunol Rev*. 2014 enero; 257(1):7-13.
3. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg S a. *Nat Rev Immunol*. 2012 Abril; 12(4):269-81.
4. Hinrichs CS, Rosenberg S a. *Immunol Rev*. 2014 enero; 257(1): 56-71.
5. Han A, Glanville J, Hansmann L, et al. *Nat Biotechnol*. 2014 Julio; 32(7):684-92.
6. Yee C. *Immunol Rev*. 2014 enero; 257(1): 250-63.
7. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. *Immunity*. 1998; 8:89-95.
8. Ho WY, Nguyen HN, Wolf M, et al. *J Immunol*. 2006; 310: 40-52.
9. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, et al. *Science* (80-). 1996; 274(5284):94-6.
10. Hadrup SR, Bakker AH, Shu CJ, et al. *Nature*. 2009; 6(7): 520-6.
11. Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, et al. *Nat Med*. 2002; 8(6):631-7.
12. Bakker AH, Schumacher TNM. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17:428-33.
13. Davis MM, Altman JD, Newell EW. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(8):551-8.
14. Pascolo BS, Bervas N, Ure JM, et al. *J Exp Med*. 1997; 185(12).
15. Boucherma R, Kridane-Miledi H, Bouziat R, et al. *J Immunol*. 2013 Julio 15; 191(2): 583-93.
16. Li L-P, Lampert JC, Chen X, et al. *Nat Med*. 2010 Septiembre;16(9): 1029-34.
17. Fontana R, Bregni M, Cipponi A, et al. *Blood*. 2009; 113 (8): 1651-61.
18. Lamers CHJ, Willemsen R, Elzakker P Van, et al. *Blood*. 2011; 117 (1): 72-83.
19. Zeng W, Su M, Anderson KS, et al. *Immunobiology*. 2014 Agosto; 219 (8): 583-92.
20. Lozzio CB, Lozzio BB. *Blood*. 1975 Marzo; 45 (3): 321-34.
21. Drew SI, Terasaki PI, Billing RJ, et al. *Blood*. 1977; 49: 715-8.
22. Boegel S, Löwer M, Bukur T, et al. *Oncoimmunology*. 2014; 3(8): 37-41.
23. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, et al. *J Immunol Methods*. 2002; 259: 95-110.
24. Suhoski MM, Golovina TN, Aqui NA, et al. *Mol Ther*. 2007; 15 (5): 981-8.
25. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, et al. *Int J Cancer*. 1976; 18: 421-31.
26. Bai X, Hosler G, Rogers BB, et al. *Clin Chem*. 1997; 43(10): 1843-9.
27. Anderson KS, Zeng W, Sasada T, et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 60(6): 857-67.
28. Latouche J, Sadelain M. *Nat Biotechnol*. 2000; 18 (Febrero).
29. Hasan AN, Kollen WJ, Trivedi D, et al. *J Immunol*. 2009; 183: 2837-50.
30. Butler MO, Ansén S, Tanaka M, et al. *Int Immunol*. 2010 Noviembre; 22(11): 863-73.
31. McKinney DM, Southwood S, Hinz D, et al. *Immunogenetics*. 2013 Mayo; 65(5): 357-70.
32. Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, et al. *Int J Hematol*. 2008 Octubre; 88(3): 311-20.
33. Wolf M, Kuball J, Ho WY, et al. *Blood*. 2007 Julio 1; 110(1): 201-10.
34. Wöfl M, Kuball J, Eyrich M, et al. *Cytometry A*. 2008; 73 (11): 1043-9.
35. Manz R, Assenmacher M, Pflugert E, et al. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92 (Marzo): 1921-5.
36. Becker C, Pohla H, Frankenberger B, et al. *Nat Med*. 2001; 7(10): 1159-62.
37. Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, et al. *Eur J Immunol*. 1999; 29: 4053-9.
38. Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, et al. *Nat Med*. 2013 Octubre 13; 19 (11): 1534-41.
39. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, et al. *Cancer Res*. 2006; 66: 8878-86.
40. Sommermeyer D, Uckert W. *J Immunol*. 2010 Jun 1; 184 (11): 6223-31.
41. Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, et al. *Cancer Res*. 2007; 67(8): 3898-903.
42. Kuball J, Dossett ML, Wolf M, et al. *Blood*. 2007; 109(6): 2331-8.
43. Zur Hausen H. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mayo; 2(5): 342-50.
44. Walboomers JM, Jacobs M V, Manos MM, et al. *J Pathol*. 1999; (Mayo): 12-9.
45. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. *Nat Rev Cancer*. 2007 enero; 7(1): 11-22.
46. Moody CA, Laimins LA. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 550-60.
47. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, et al. *J Virol*. 1993; 67(8): 4521-32.
48. Halbert CL, Galloway D a. *J Virol*. 1988 Marzo; 62(3): 1071-5.
49. Chan JL, Tsao YP, Liu DW, et al. *J Biomed Sci*. 2001; 8: 206-13.
50. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, et al. *Cancer Res*. 2010 enero 1; 70(1) :249-56.
51. Tang K-W, Alaei-Mahabadi B, Samuelsson T, et al. *Nat Commun*. 2013 Octubre 1; 4:2513.
52. Kenter GG, Welters MJP, Valentijn ARPM, et al. *N Engl J Med*. 2009 Noviembre; 361(19): 1838-47.
53. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, et al. *Vaccine*. 2012; 30 Supl. 5: F71-82.
54. Reddehase MJ. *Nat Rev Immunol*. 2002 Noviembre; 2(11): 831-44.
55. Ghazi A, Ashoori A, Hanley P, et al. *J Immunother*. 2012; 35(2): 159-68.
56. Schuessler A, Smith C, Beagley L, et al. *Cancer Res*. 1 Julio 2014; 74(13): 3466-76.

57. Wick W, Platten M. *Neuro Oncol.* 2014; 16(3): 332-3.
 58. Söderberg-Naucler C, Rahbar A, Stragliotto G. *N Engl J Med.* 5 septiembre 2013; 369 (10): 984-5.
 59. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, et al. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 (Noviembre 2010): 913-9.
 60. Chervin AS, Aggen DH, Raseman JM, et al. *J Immunol Methods.* 2008; 339(2): 175-84.
 5 61. Robbins PF, Li YF, El-Gamil M, et al. *J Immunol.* 2008; 180: 6116-31.
 62. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus M V, et al. *Blood.* 2013; 122(6): 863-72.
 63. Liddy N, Bossi G, Adams KJ, et al. *Nat Med.* 6 mayo 2012; 18(6).
 64. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. *Blood.* 2002; 99(11): 3916-22.
 65. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, et al. *Blood.* 1991; 78: 1373-80.
 10 66. Dössinger G, Bunse M, Bet J, et al. *PLoS One.* Enero 2013; 8(4):e61384.
 67. Khan N, Shariff N, Cobbold M, et al. *J Immunol.* 2002; 169.
 68. Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, et al. *Mol Ther.* 2000; 2(4): 435-45.
 69. Baum C, Hegewisch-becker S, Eckert H, et al. *J Virol.* 1995; 69(12): 7541-7.
 70. Engels B, Cam H, Schöler T, et al. *Hum Gene Ther.* 10 agosto 2003; 14 (12): 1155-68.
 15 71. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, et al. *J Mol Med.* 2008; 86(5): 573-83.
 72. Bürdek M, Spranger S, Wilde S, et al. *J Transl Med.* 2010 enero; 8: 90.
 73. Spranger S, Javorovic M, Bürdek M, et al. *J Immunol.* 1 julio 2010; 185(1): 738-47.
 74. Wilde S, Sommermeyer D, Frankenberger B, et al. *Blood.* 2009 Septiembre; 114 (10): 2131-9.
 75. Spranger S, Jeremias I, Wilde S, et al. *Blood.* 2012; 119: 3440-9.
 20 76. Melief CJM. *Immunity.* 2008 Sep 19; 29(3): 372-83.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0104]

- 25 <110> Max-Delbrueck-Centrum fuer Molekulare Medizin, et al.
 <120> Procedimiento de detección de nuevos epítomos de células T
 30 inmunogénicas y aislamiento de nuevos receptores de células T específicas de
 antígeno mediante una biblioteca de células de MHC
 <130> MDC15851PCT
 <160> 71
 35 <170> BISSAP 1.3
 <210> 1
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> virus del papiloma alfa 9
 <220>
 45 <223> Epítomo de E5 de VPH 16 restringido a HLA-B*15:01
 <400> 1
 Ser Ala Phe Arg Cys Phe Ile Val Tyr
 1 5
 50 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> CDR3 de TRA específica para el epítomo de E5
 <400> 2
 Cys Ala Glu Ser Glu Tyr Gly Asn Lys Leu Val Phe
 60 1 5 10
 <210> 3
 <211> 131
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 790 725 T3

<223> region variable de TRA específica para el epítopo de E5, TRAV17

<400> 3

5 Met Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Val Asn Ser Gln Gln Gly Glu Asp Pro Gln Ala Leu Ser
 20 25 30
 Ile Gln Glu Gly Glu Asn Ala Thr Met Asn Cys Ser Tyr Lys Thr Ser
 35 40 45
 10 Ile Asn Asn Leu Gln Trp Tyr Arg Gln Asn Ser Gly Arg Gly Leu Val
 50 55 60
 His Leu Ile Leu Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu Lys His Ser Gly Arg
 65 70 75 80
 Leu Arg Val Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys Ser Ser Ser Leu Leu Ile
 85 90 95
 15 Thr Ala Ser Arg Ala Ala Asp Thr Ala Ser Tyr Phe Cys Ala Glu Ser
 100 105 110
 Glu Tyr Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ile Leu Arg Val
 115 120 125
 20 Lys Ser Tyr
 130

<210> 4

<211> 267

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRA específica para el epítopo de E5, optimizada

30 <400> 4
 Met Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 35 Ala Arg Val Asn Ser Gln Gln Gly Glu Asp Pro Gln Ala Leu Ser
 20 25 30
 Ile Gln Glu Gly Glu Asn Ala Thr Met Asn Cys Ser Tyr Lys Thr Ser
 35 40 45
 Ile Asn Asn Leu Gln Trp Tyr Arg Gln Asn Ser Gly Arg Gly Leu Val
 50 55 60
 40 His Leu Ile Leu Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu Lys His Ser Gly Arg
 65 70 75 80
 Leu Arg Val Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys Ser Ser Ser Leu Leu Ile
 85 90 95
 45 Thr Ala Ser Arg Ala Ala Asp Thr Ala Ser Tyr Phe Cys Ala Glu Ser
 100 105 110
 Glu Tyr Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ile Leu Arg Val
 115 120 125
 Lys Ser Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp
 130 135 140
 50 Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
 145 150 155 160
 Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp
 165 170 175
 55 Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala
 180 185 190
 Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys
 195 200 205
 Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr
 210 215 220
 60 Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn
 225 230 235 240
 Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
 245 250 255
 65 Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265

<210> 5

<211> 804

ES 2 790 725 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> TRA específica para el epítipo de E5, optimizada

<400> 5
atggaaacac tgctgggcgt gtcctcgtg atcctgtggc tgcagctggc tagagtgaac 60
10 agccagcagg gcgaggaaga tcctcaggcc ctgagcatcc aggaaggcga gaacgccacc 120
atgaactgca gctacaagac cagcatcaac aacctgcagt ggtacaggca gaatagcggc 180
agaggactgg tgcacctgat cctgatccgg tccaacgaga gagagaagca ctccggcaga 240
15 ctgagagtga ccctggacac ctccaagaag tccagctccc tgctgattac cgccagcaga 300
gccgccgata ccgcctccta cttttgcgcc gagagcgagt acggcaacaa gctggtgttt 360
20 ggcgccgaa ccatcctgcg cgtgaagtcc tacatccaga accccgagcc cgccgtgtat 420
cagctgaagg accccagaag ccaggacagc accctgtgcc tgttcaccga cttcgacagc 480
cagatcaacg tgcccaagac catggaaagc ggcaccttca tcaccgataa gaccgtgctg 540
25 gacatgaagg ccatggacag caagagcaac ggcgccattg cctggtccaa ccagaccagc 600
ttcacatgcc aggacatctt caaagagaca aacgccacct accccagcag cgacgtgccc 660
30 tgtgatgcca ccctgaccga gaagtccttc gagacagaca tgaatctgaa cttccagaac 720
ctgagcgtga tgggcctgag aatcctgctg ctgaaggctg ccggcttcaa cctgctgatg 780
35 accctgagac tgtggtccag ctga 804

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de TRB específica para el epítipo de E5
45 <400> 6
Cys Ala Ser Ser Tyr Arg Gln Gln Glu Thr Gln Tyr Phe
1 5 10

50 <210> 7
<211> 131
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> región variable de TRB específica para el epítipo de E5, TRBV6-5

<400> 7
Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
1 5 10 15
60 Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
20 25 30
Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
35 40 45
65 Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
50 55 60
Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65 70 75 80
Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg

ES 2 790 725 T3

5 Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 85 90
 Ser Tyr Arg Gln Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 110 125
 Leu Val Leu
 130

10 <210> 8
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> TRB específica para el epítipo de E5, optimizada

20 <400> 8
 Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
 1 5 10
 Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
 20 25 30
 Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 40 45
 Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
 65 70 75 80
 Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
 85 90 95
 30 Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Arg Gln Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 35 Leu Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu
 130 135 140
 Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175
 40 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 195 200 205
 45 Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 210 215 220
 Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 245 250 255
 50 Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala
 260 265 270
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 275 280 285
 55 Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
 290 295 300

60 <210> 9
 <211> 915
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> TRB específica para el epítipo de E5, optimizada

<400> 9
 atgtctatcg gcctgctgtg ttgtgccgcc ctgtccctgc tgtgggccgg acctgtgaat

ES 2 790 725 T3

gctggcgtga cccagacccc caagttccag gtgctgaaaa ccggccagag catgaccctg 120
 5 cagtgcgccc aggacatgaa ccacgagtac atgagctggt acagacagga ccccggcatg 180
 ggcctgcggc tgatccacta ttctgtggga gccggcatca ccgaccaggg cgaagtgccc 240
 aatggctaca acgtgtccag aagcaccacc gaggacttcc cactgcggct gctgtctgcc 300
 10 gccccatctc agaccagcgt gtacttctgc gccagcagct accggcagca ggaaaccag 360
 tacttcggcc ctggcaccag actgctggtg ctggaagatc tgcggaacgt gacccccccc 420
 aaggtgtccc tgttcgagcc tagcaaggcc gagatcgcca acaagcagaa agccaccctc 480
 15 gtgtgcctgg ccagaggctt cttccccgac catgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540
 aaagaggtgc acagcggcgt gtccaccgat ccccaggcct acaaagagag caactacagc 600
 20 tactgcctga gcagcaggct gcggggtgtcc gccaccttct ggcaacaacc ccggaaccac 660
 ttcagatgcc aggtgcagtt ccacggcctg agcgaagagg acaagtggcc tgagggcagc 720
 cccaagcccg tgacacagaa tatctctgcc gaagcctggg gcagagccga ctgtggcatt 780
 25 accagcgcca gctaccatca gggcgtgctg agcgcacca tcctgtacga gatcctgctg 840
 ggcaaggcca ccctgtacgc cgtgctggtg tcaggcctgg tgctgatggc catggtcaag 900
 30 aagaagaaca gctga 915

35 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Cytomegalovirus

40 <220>
 <223> epítopo de pp65 de CMV restringido a HLA-B*07:02

45 <400> 10
 Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met
 1 5 10

50 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> CDR3 de TRA específica para epítopo de pp65

60 <400> 11
 Cys Ala Thr Val Ile Arg Met Asp Ser Ser Tyr Lys Leu Ile Phe
 1 5 10 15

65 <210> 12
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> región variable de TRA específica para epítopo de pp65, TRAV17

75 <400> 12
 Met Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Val Asn Ser Gln Gln Gly Glu Glu Asp Pro Gln Ala Leu Ser

ES 2 790 725 T3

5 Ile Gln Glu Gly²⁰ Glu Asn Ala Thr²⁵ Met Asn Cys Ser Tyr³⁰ Lys Thr Ser
 Ile Asn³⁵ Asn Leu Gln Trp Tyr⁴⁰ Arg Gln Asn Ser Gly⁴⁵ Arg Gly Leu Val
 His⁵⁰ Leu Ile Leu Ile Arg⁵⁵ Ser Asn Glu Arg Glu⁶⁰ Lys His Ser Gly Arg
 Leu Arg Val⁶⁵ Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys⁷⁰ Ser Ser Ser Leu Leu Ile
 Thr Ala Ser Arg⁷⁵ Ala Ala Asp Thr Ala⁸⁰ Ser Tyr Phe Cys Ala Thr Val
 Ile Arg Met⁸⁵ Asp Ser Ser Tyr Lys⁹⁰ Leu Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg
 Leu Leu Val⁹⁵ Arg Pro Asp
 10
 15
 20

<210> 13
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRA específica para epítipo de pp65, optimizada

25 <400> 13
 Met Glu Thr Leu⁵ Leu Gly Val Ser Leu Val¹⁰ Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 Ala Arg Val¹⁵ Asn Ser Gln Gln Gly Glu²⁰ Glu Asp Pro Gln Ala Leu Ser
 30 Ile Gln Glu Gly²⁵ Glu Asn Ala Thr Met Asn Cys Ser Tyr³⁰ Lys Thr Ser
 Ile Asn³⁵ Asn Leu Gln Trp Tyr⁴⁰ Arg Gln Asn Ser Gly⁴⁵ Arg Gly Leu Val
 His⁵⁰ Leu Ile Leu Ile Arg⁵⁵ Ser Asn Glu Arg Glu⁶⁰ Lys His Ser Gly Arg
 35 Leu Arg Val⁶⁵ Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys⁷⁰ Ser Ser Ser Leu Leu Ile
 Thr Ala Ser Arg⁷⁵ Ala Ala Asp Thr Ala⁸⁰ Ser Tyr Phe Cys Ala Thr Val
 40 Ile Arg Met⁸⁵ Asp Ser Ser Tyr Lys⁹⁰ Leu Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg
 Leu Leu Val⁹⁵ Arg Pro Asp Ile¹⁰⁰ Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln
 Leu Lys Asp Pro Arg Ser¹⁰⁵ Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp
 45 Phe Asp Ser Gln¹¹⁰ Ile Asn Val Pro Lys Thr¹¹⁵ Met Glu Ser Gly Thr Phe
 Ile Thr Asp Lys¹²⁰ Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser
 50 Asn Gly Ala Ile¹²⁵ Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp
 Ile Phe¹³⁰ Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser¹³⁵ Asp Val Pro Cys
 Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn
 55 Phe Gln Asn Leu Ser¹⁴⁰ Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
 Ala Gly Phe Asn¹⁴⁵ Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 60

<210> 14
 <211> 813
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TRA específica para epítipo de pp65, optimizada

ES 2 790 725 T3

<400> 14
 atggaaacac tgctgggcgt gtcactcgtg atcctgtggc tgcagctggc tagagtgaac 60
 5 agccagcagg gggaagagga ccctcaggcc ctgagcattc aggaaggcga gaacgccacc 120
 atgaactgca gctacaagac cagcatcaac aacctgcagt ggtacaggca gaactccggc 180
 agaggactgg tgcacctgat cctgatccgg tccaacgaga gagagaagca ctccggacgg 240
 10 ctgagagtga ccctggacac ctccaagaag tccagctccc tgctgattac cgccagcaga 300
 gccgccgata ccgcctccta cttttgcgcc accgtgatcc ggatggacag ctctacaag 360
 ctgatctttg gcagcggcac cagactgctc gtgcggcccg atatccagaa ccctgagcct 420
 15 gccgtgtacc agctgaagga ccccagaagc caggacagca cactgtgcct gttcaccgac 480
 ttcgacagcc agatcaacgt gcccaagacc atggaaagcg gcaccttcat caccgacaag 540
 20 acagtgctgg acatgaaggc catggacagc aagagcaacg gcgccattgc ctggtccaac 600
 cagaccagct tcacatgcca ggacatcttc aaagagacaa acgccaccta ccccagcagc 660
 25 gacgtgccct gtgatgccac cctgaccgag aagtccttcg agacagacat gaacctgaat 720
 ttccagaacc tgtccgtgat gggcctgaga atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaat 780
 ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc tga 813

30
 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> CDR3 de TRB específica para epítipo de pp65
 40 <400> 15
 Cys Ala Ser Ser Leu Ile Gly Val Ser Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
 1 5 10 15

45
 <210> 16
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> región variable de TRB específica para epítipo de pp65, TRBV7-9

<400> 16
 55 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr
 20 25 30
 Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
 35 40 45
 60 Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
 85 90 95
 65 Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Ile Gly Val Ser Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro

ES 2 790 725 T3

115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 130 135

5 <210> 17
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> TRB específica para epítipo de pp65, optimizada

<400> 17
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr
 20 25 30 35 40 45
 Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
 50 55 60 65 70 75 80
 Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
 85 90 95 100 105 110 115
 Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
 120 125 130 135 140 145 150 155 160
 Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
 165 170 175 180 185 190 195 200 205
 25 Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205
 Ser Ser Leu Ile Gly Val Ser Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro
 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro
 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln
 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val
 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp
 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala
 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly
 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
 275 280 285 290 295 300
 50 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
 290 295 300
 Lys Lys Asn Ser
 305

55 <210> 18
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> TRB específica para epítipo de pp65, optimizada

<400> 18
 atgggaacat ctctgctgtg ttggatggcc ctgtgcctgc tgggagccga tcatgccgat 60
 65 acaggcgtgt cccaggaccc ccggcacaag attaccaagc ggggccagaa cgtgacctc 120
 agatgcgacc ccatcagcga gcacaaccgg ctgtactggt acagacagac cctgggccag 180

ES 2 790 725 T3

ggacccgagt tctgacctta cttccagaac gaggcccagc tggaaaagag ccggctgctg 240
 5 agcgacagat tcagcgccga aagacccaag ggcagcttca gcaccctgga aatccagcgg 300
 accgagcagg gcgacagcgc catgtatctg tgtgccagca gcctgatcgg cgtgtccagc 360
 tacaacgagc agttcttcgg ccctggcacc cggctgaccg tgctggaaga tctgagaaac 420
 10 gtgaccccc ccaaggtgtc cctgttcgag cctagcaagg ccgagatcgc caacaagcag 480
 aaagccacc tcgtgtgcct ggccagaggc ttcttccccg accatgtgga actgtcttgg 540
 15 tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggg gtgtccaccg acccccaggc ctacaaagag 600
 agcaactaca gctactgcct gagcagcaga ctgctgggtgt ccgccacctt ctggcacaac 660
 ccccggaacc acttcaggtg ccaggtgcag tttcacggcc tgagcgaaga ggacaagtgg 720
 20 cccgagggca gccctaagcc cgtgaccagc aatatctctg ccgaagcctg gggcagagcc 780
 gactgtggca ttaccagcgc cagctaccat cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840
 25 gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtctggcct ggtgctgatg 900
 gccatggtca agaagaagaa cagctga 927

30 <210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Homsap TRAV38-2/DV8*01 F

40 <400> 19
 Cys Ala Tyr Arg Ser Trp Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe
 1 5 10

45 <210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Homsap TRAV8-6*02 F

50 <400> 20
 Cys Ala Val Ser Glu Pro Ala Ala Gly Asn Lys Leu Thr Phe
 1 5 10

55 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Homsap TRAV26-2*01 F

<400> 21
 Cys Ile Leu Arg Gly Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15

65 <210> 22
 <211> 12

ES 2 790 725 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Homsap TRAV8-6*02 F

 <400> 22
 Cys Ala Val Ile Thr Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe
 1 5 10
 10
 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Homsap TRAV25*01 F

 <400> 23
 20 Cys Ala Gly Pro Pro Ser Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe
 1 5 10

 <210> 24
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Homsap TRAV6*02 (F)
 30
 <400> 24
 Cys Ala Leu Pro Met Glu Tyr Gly Asn Lys Leu Val Phe
 1 5 10
 35
 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Homsap TRBV5-1*01 F

 <400> 25
 45 Cys Ala Ser Ser Ser Arg Gly His Gln Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe
 1 5 10 15

 <210> 26
 50 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Homsap TRBV12-3*01 F

 <400> 26
 Cys Ala Ser Ser Pro Glu Gly Glu Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe
 1 5 10 15
 60

 <210> 27
 <211> 13
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 790 725 T3

<223> Homsap TRBV5-1*01 F
 <400> 27
 5 Cys Ala Ser Thr Leu Arg Gly Tyr Thr Glu Ala Phe Phe
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Homsap TRBV5-5*02 (F)
 15 <400> 28
 Cys Ala Ser Ser Pro Trp Ala Asp Ser Asn Gln Pro Gln His Phe
 1 5 10 15
 <210> 29
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Homsap TRBV20-1*01 F
 <400> 29
 Cys Ser Ala Gly Thr Ser Gly Gly Pro Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10 15
 30 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Homsap TRBV27*01 F
 <400> 30
 40 Cys Ala Ser Ser Ser Pro Leu Ala Asp Asp Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
 1 5 10 15
 45 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Homsap TRBV6-2*01 F
 <400> 31
 55 Cys Ala Ser Ser His Arg Arg Ala His Arg Ala Arg Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10 15
 60 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Homsap TRAV14/DV4*01 F
 <400> 32
 Cys Ala Met Arg Glu Gly Lys Asp Ser Ser Tyr Lys Leu Ile Phe

ES 2 790 725 T3

	1	5	10	15
	<210> 33			
	<211> 14			
5	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Homsap TRAV8-1*01 F			
10	<400> 33			
	Cys Ala Val Asn Arg Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe			
	1	5	10	
15	<210> 34			
	<211> 13			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
20	<220>			
	<223> Homsap TRAV3*01 F			
	<400> 34			
	Cys Ala Val Arg Asp Ile Gly Gly Phe Lys Thr Ile Phe			
25	1	5	10	
	<210> 35			
	<211> 10			
	<212> PRT			
30	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Homsap TRAV1-2*01 F			
35	<400> 35			
	Cys Ala Leu Asp Gly Gln Lys Leu Leu Phe			
	1	5	10	
40	<210> 36			
	<211> 13			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
45	<223> Homsap TRAV4*01 F			
	<400> 36			
	Cys Leu Val Gly Gly Leu Arg Gly Asn Val Leu His Cys			
50	1	5	10	
	<210> 37			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
55	<220>			
	<223> Homsap TRBV27*01 F			
	<400> 37			
60	Cys Ala Ser Arg Leu Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Glu Gln Phe Phe			
	1	5	10	15
	<210> 38			
	<211> 17			
65	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			

ES 2 790 725 T3

<223> Homsap TRBV20-1*01 F

<400> 38

5 Cys Ser Ala Ser Pro Arg Asp Arg Lys Phe Ser Gly Asn Thr Ile Tyr
 1 5 10 15
 Phe

<210> 39

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Homsap TRBV7-9*03 F

<400> 39

20 Cys Ala Ser Ser Ser His Asp Asn Gln Gly Ala Lys Ser Pro Leu His
 1 5 10 15
 Phe

<210> 40

25 <211> 1782

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cassette transgénico de TCR específico para el epítipo de E5

<400> 40

atgtctatcg gcctgctgtg ttgtgccgcc ctgtccctgc tgtgggccgg acctgtgaat 60
 gctggcgtga cccagacccc caagttccag gtgctgaaaa ccggccagag catgaccctg 120
 35 cagtgcgccc aggacatgaa ccacgagtac atgagctggt acagacagga ccccggcatg 180
 ggctgctgccc tgatccacta ttctgtggga gccggcatca ccgaccaggg cgaagtggcc 240
 40 aatggctaca acgtgtccag aagcaccacc gaggacttcc cactgctggct gctgtctgcc 300
 gccccatctc agaccagcgt gtacttctgc gccagcagct accggcagca ggaaaccag 360
 tacttctggc ctggcaccag actgctggtg ctggaagatc tgcggaacgt gacccccccc 420
 45 aaggtgtccc tgttcgagcc tagcaaggcc gagatcgcca acaagcagaa agccaccctc 480
 gtgtgcctgg ccagaggctt cttccccgac catgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540
 50 aaagaggtgc acagcggcgt gtccaccgat cccaggcct acaaagagag caactacagc 600
 tactgcctga gcagcaggct gcgggtgtcc gccaccttct ggcaacaacc ccggaaccac 660
 ttcagatgcc aggtgcagtt ccacggcctg agcgaagagg acaagtggcc tgagggcagc 720
 55 cccaagcccg tgacacagaa tatctctgcc gaagcctggg gcagagccga ctgtggcatt 780
 accagcgcga gctaccatca gggcgtgctg agcggccacca tcctgtacga gatcctgctg 840
 60 ggcaaggcca ccctgtacgc cgtgctggtg tcaggcctgg tgctgatggc catggtcaag 900
 aagaagaaca gcggcagcgg cggccaccaac ttagcctgctc tgaaacaggc cggcgacgtg 960
 gaagagaacc ccgggcccac ggaaacactg ctgggcgtgt ccctcgtgat cctgtggctg 1020
 65 cagctggcta gagtgaacag ccagcagggc gaggaagatc ctgagccct gagcatccag 1080
 gaaggcgaga acgcccacat gaactgcagc tacaagacca gcatcaaaa cctgcagtgg 1140

ES 2 790 725 T3

	tacaggcaga atagcggcag aggactggtg cacctgatcc tgatccggtc caacgagaga	1200
5	gagaagcact ccggcagact gagagtgacc ctggacacct ccaagaagtc cagctccctg	1260
	ctgattaccg ccagcagagc cgccgatacc gcctcctact tttgcgccga gagcgagtac	1320
	ggcaacaagc tgggtgtttgg cgccggaacc atcctgcgcg tgaagtccata catccagaac	1380
10	cccagagcccg ccgtgtatca gctgaaggac cccagaagcc aggacagcac cctgtgcctg	1440
	ttcaccgact tcgacagcca gatcaacgtg cccaagacca tggaaagcgg caccttcac	1500
15	accgataaga ccgtgctgga catgaaggcc atggacagca agagcaacgg cgccattgcc	1560
	tgggtccaacc agaccagctt cacatgccag gacatcttca aagagacaaa cgccacctac	1620
	cccagcagcg acgtgccctg tgatgccacc ctgaccgaga agtccttcga gacagacatg	1680
20	aatctgaact tccagaacct gagcgtgatg ggcttgagaa tcctgctgct gaaggtggcc	1740
	ggcttcaacc tgctgatgac cctgagactg tgggtccagct ga	1782
25	<210> 41 <211> 1803 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cassette transgénico de TCR específico para el epítipo de pp65	
	<400> 41	
35	atgggaacat ctctgctgtg ttggatggcc ctgtgcctgc tgggagccga tcatgccgat	60
	acaggcgtgt cccaggaccc ccggcacaag attaccaagc ggggcccagaa cgtgaccttc	120
	agatgcgacc ccatcagcga gcacaaccgg ctgtactggt acagacagac cctgggcccag	180
40	ggacccgagt tcctgacctt cttccagaac gagggcccagc tggaaaagag ccggctgctg	240
	agcgacagat tcagcgccga aagacccaag ggcagcttca gcaccctgga aatccagcgg	300
45	accgagcagg gcgacagcgc catgtatctg tgtgccagca gcctgatcgg cgtgtccagc	360
	tacaacgagc agttcttcgg ccctggcacc cggctgaccg tgctggaaga tctgagaaac	420
	gtgaccccc ccaaggtgtc cctgttcgag cctagcaagg ccgagatcgc caacaagcag	480
50	aaagccacc tcgtgtgcct ggccagaggc ttcttccccg accatgtgga actgtcttgg	540
	tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggg gtgtccaccg acccccaggc ctacaaagag	600
55	agcaactaca gctactgcct gagcagcaga ctgctgggtgt ccgccacctt ctggcacaac	660
	ccccggaacc acttcaggtg ccagggtcag tttcacggcc tgagcgaaga ggacaagtgg	720
	cccaggggca gccctaagcc cgtgaccagc aatatctctg ccgaagcctg gggcagagcc	780
60	gactgtggca ttaccagcgc cagctaccat cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac	840
	gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtctggcct ggtgctgatg	900
65	gccatggtca agaagaagaa cagcggcagc ggcgccacca acttcagcct gctgaaacag	960
	gccggcgacg tggaagagaa ccccgggccc atggaaacac tgctgggcgt gtcactcgtg	1020
	atcctgtggc tgcagctggc tagagtgaac agccagcagg gggaagagga ccctcaggcc	1080

ES 2 790 725 T3

ctgagcattc aggaaggcga gaacgccacc atgaactgca gctacaagac cagcatcaac 1140
5 aacctgcagt ggtacaggca gaactccggc agaggactgg tgcacctgat cctgatccgg 1200
tccaacgaga gagagaagca ctccggacgg ctgagagtga ccctggacac ctccaagaag 1260
tccagctccc tgctgattac cgccagcaga gccgccgata ccgcctccta cttttgcgcc 1320
10 accgtgatcc ggatggacag ctctacaag ctgatctttg gcagcggcac cagactgctc 1380
gtgcgggccc atatccagaa ccctgagcct gccgtgtacc agctgaagga ccccagaagc 1440
caggacagca cactgtgcct gttcaccgac ttcgacagcc agatcaacgt gcccaagacc 1500
15 atggaaagcg gcaccttcat caccgacaag acagtgctgg acatgaaggc catggacagc 1560
aagagcaacg gcgccattgc ctggtccaac cagaccagct tcacatgcca ggacatcttc 1620
20 aaagagaaa acgccaccta cccagcagc gacgtgccct gtgatgccac cctgaccgag 1680
aagtccttcg agacagacat gaacctgaat ttccagaacc tgtccgtgat gggcctgaga 1740
25 atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaat ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc 1800
tga 1803

30 <210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Virus del papiloma alfa 9

35 <220>
<223> epítipo potencial de E5

40 <400> 42
Leu Ile Arg Pro Leu Leu Leu Ser Val Ser Thr Tyr
1 5 10

45 <210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> Virus del papiloma alfa 9

50 <220>
<223> epítipo potencial de E5

55 <400> 43
Leu Leu Ile Arg Pro Leu Leu Leu Ser Val Ser Thr Tyr
1 5 10

60 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del papiloma alfa 9

65 <220>
<223> epítipo potencial de E5

70 <400> 44
Phe Leu Ile His Thr His Ala Arg Phe
1 5

<210> 45
<211> 10

<212> PRT
 <213> Virus del papiloma alfa 9

 <220>
 5 <223> epítipo potencial de E5

 <400> 45
 Ala Ser Ala Phe Arg Cys Phe Ile Val Tyr
 1 5 10

 10 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma alfa 9

 15 <220>
 <223> epítipo potencial de E5

 <400> 46
 20 Leu Leu Trp Ile Thr Ala Ala Ser Ala Phe
 1 5 10

 <210> 47
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma alfa 9

 <220>
 <223> epítipo de E5
 30
 <400> 47
 Ile Thr Ala Ala Ser Ala Phe Arg Cys Phe Ile Val Tyr
 1 5 10

 35 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma alfa 9

 40 <220>
 <223> epítipo potencial de E5

 <400> 48
 45 Leu Leu Leu Ser Val Ser Thr Tyr
 1 5

 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Virus del papiloma alfa 9

 <220>
 <223> epítipo de E5

 55 <400> 49
 Ala Ala Ser Ala Phe Arg Cys Phe Ile Val Tyr
 1 5 10

 60 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma alfa 9

 <220>
 65 <223> epítipo potencial de E5

 <400> 50
 Ser Ala Phe Arg Cys Phe Ile Val Tyr Ile Ile Phe Val Tyr

ES 2 790 725 T3

<223> epítopo potencial de E5

<400> 56
 5 Leu Ile His Thr His Ala Arg Phe
 1 5

<210> 57
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Virus del papiloma alfa 9

<220>
 <223> epítopo de E5

15 <400> 57
 Leu Leu Trp Ile Thr Ala Ala Ser Ala Phe Arg Cys Phe
 1 5 10

20 <210> 58
 <211> 593
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> cassette de TCR específico para el epítopo de E5

<400> 58
 30 Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
 1 5 10
 Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
 20 25 30
 Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 35 40 45
 Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
 65 70 75 80
 Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
 85 90 95
 40 Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Arg Gln Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 45 Leu Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu
 130 135 140
 Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175
 50 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 195 200 205
 55 Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 210 215 220
 Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 245 250 255
 60 Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala
 260 265 270
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 275 280 285
 65 Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Asn Ser
 290 295 300
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 305 310 315 320
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Thr Leu Leu Gly Val Ser Leu Val

ES 2 790 725 T3

Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ala Arg Val Asn Ser Gln Gln Gly Glu Glu
 325 330 335
 340 345 350
 5 Asp Pro Gln Ala Leu Ser Ile Gln Glu Gly Glu Asn Ala Thr Met Asn
 355 360 365
 Cys Ser Tyr Lys Thr Ser Ile Asn Asn Leu Gln Trp Tyr Arg Gln Asn
 370 375 380
 Ser Gly Arg Gly Leu Val His Leu Ile Leu Ile Arg Ser Asn Glu Arg
 385 390 395 400
 10 Glu Lys His Ser Gly Arg Leu Arg Val Thr Leu Asp Thr Ser Lys Lys
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Ile Thr Ala Ser Arg Ala Ala Asp Thr Ala Ser
 420 425 430
 Tyr Phe Cys Ala Glu Ser Glu Tyr Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala
 435 440 445
 15 Gly Thr Ile Leu Arg Val Lys Ser Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala
 450 455 460
 Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu
 465 470 475 480
 20 Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser
 485 490 495
 Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp
 500 505 510
 Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr
 515 520 525
 Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp
 530 535 540
 Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met
 545 550 555 560
 30 Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu
 565 570 575
 Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser
 580 585 590
 Ser

<210> 59
 <211> 600
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cassette de TCR específico para el epítipo de pp65

45 <400> 59
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr
 20 25 30
 50 Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
 35 40 45
 Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
 85 90 95
 Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 60 Ser Ser Leu Ile Gly Val Ser Ser 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
 65 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

ES 2 790 725 T3

			180					185				190				
	Thr	Asp	Pro	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Cys	Leu	Ser
			195					200				205				
5	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		
10	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Ile	Thr	Ser	Ala	Ser	Tyr	His	Gln	Gly
				260					265					270		
	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
			275					280					285			
15	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
		290					295					300				
	Lys	Lys	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln
	305					310					315					320
	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Glu	Thr	Leu	Leu	Gly	
					325				330					335		
20	Val	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Ala	Arg	Val	Asn	Ser	Gln
				340					345					350		
	Gln	Gly	Glu	Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Leu	Ser	Ile	Gln	Glu	Gly	Glu	Asn
			355					360					365			
25	Ala	Thr	Met	Asn	Cys	Ser	Tyr	Lys	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp
		370					375					380				
	Tyr	Arg	Gln	Asn	Ser	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	His	Leu	Ile	Leu	Ile	Arg
	385					390					395					400
	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Lys	His	Ser	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Thr	Leu	Asp
					405					410					415	
30	Thr	Ser	Lys	Lys	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Ile	Thr	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala
				420					425					430		
	Asp	Thr	Ala	Ser	Tyr	Phe	Cys	Ala	Thr	Val	Ile	Arg	Met	Asp	Ser	Ser
			435					440					445			
35	Tyr	Lys	Leu	Ile	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Pro	Asp
		450					455					460				
	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Arg	Ser
	465					470					475					480
	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Ile	Asn
					485					490					495	
40	Val	Pro	Lys	Thr	Met	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val
				500					505					510		
	Leu	Asp	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly	Ala	Ile	Ala	Trp
			515					520					525			
45	Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys	Glu	Thr	Asn
		530					535					540				
	Ala	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu
	545					550					555					560
	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val
					565					570					575	
50	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu
				580					585					590		
	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser								
			595					600								
55	<210>	60														
	<211>	393														
	<212>	ADN														
	<213>	Secuencia artificial														
60	<220>															
	<223>	región variable de TRA específica para el epítipo de E5, TRAV17														
	<400>	60														
	atggaaactc	tcttgggagt	gtctttggtg	attctatggc	ttcaactggc	tagggatgaac										60
65	agtcaacagg	gagaagagga	tcctcaggcc	ttgagcatcc	aggagggtga	aatgcccacc										120
	atgaactgca	gttacaaaac	tagtataaac	aatttacagt	ggtatagaca	aaattcaggt										180

ES 2 790 725 T3

agaggccttg tccacctaattttaatacgt tcaaatgaaa gagagaaaca cagtggaaga 240
 5 ttaagagtca cgcttgacac ttccaagaaa agcagttcct tgttgatcac ggcttcccgg 300
 gcagcagaca ctgcttctta cttctgtgcc gaatccgaat atggaaacaa actggtcttt 360
 ggcgcaggaa ccattctgag agtcaagtcc tat 393
 10 <210> 61
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> región variable de TRB específica para el epítipo de E5, TRBV6-5
 <400> 61
 20 atgagcatcg gcctcctgtg ctgtgcagcc ttgtctctcc tgtgggcagg tccagtgaat 60
 gctggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 120
 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 180
 25 gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 240
 aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 300
 30 gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt accggcagca agagaccag 360
 tacttcgggc caggcacgcy gctcctggtg ctc 393
 35 <210> 62
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> región variable de TRA específica para epítipo de pp65, TRAV17
 <400> 62
 45 atggaaactc tcctgggagt gtcattggtg attctatggc ttcaactggc tagggtgaac 60
 agtcaacagg gagaagagga tcctcaggcc ttgagcatcc aggagggtga aaatgccacc 120
 atgaactgca gttacaaaac tagtataaac aatttacagt ggtatagaca aaattcaggt 180
 50 agaggccttg tccacctaattttaatacgt tcaaatgaaa gagagaaaca cagtggaaga 240
 ttaagagtca cgcttgacac ttccaagaaa agcagttcct tgttgatcac ggcttcccgg 300
 gcagcagaca ctgcttctta cttctgtgct acggttatcc ggatggatag cagctataaa 360
 55 ttgatcttcg ggagtgggac cagactgctg gtcaggcctg at 402
 60 <210> 63
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> región variable de TRB específica para epítipo de pp65, TRBV7-9
 <400> 63
 Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys

ES 2 790 725 T3

1 Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Cys Thr
 5 Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala
 Gly Ala Thr Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Thr Gly
 Gly Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Cys
 10 Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala
 Ala Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr Gly
 15 Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala
 Thr Cys Cys Ala Ala Thr Thr Thr Cys Thr Gly Ala Ala Cys Ala Cys
 Ala Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr
 20 Ala Cys Cys Gly Ala Cys Ala Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly
 Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr
 Cys Thr Gly Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala
 25 Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Gly Ala
 Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys
 30 Ala Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly
 Cys Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly
 Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr Thr Gly
 35 Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Ala Cys Ala Gly
 Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys Thr Cys Gly Gly Cys
 40 Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys
 Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Ala Ala Thr Ala Gly Gly Gly Gly
 Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala
 45 Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys Ala
 Gly Gly Gly Ala Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly
 50 Thr Gly Cys Thr Ala
 405

<210> 64
 <211> 5
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> CDR1 de TRA específica para el epítipo de E5

<400> 64
 Thr Ser Ile Asn Asn
 1 5

65 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 790 725 T3

<220>
<223> CDR2 de TRA específica para el epítipo de E5

5 <400> 65
Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu
1 5

10 <210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de TRB específica para el epítipo de E5

<400> 66
Met Asn His Glu Tyr
1 5

20 <210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR2 de TRB específica para el epítipo de E5

30 <400> 67
Ser Val Gly Ala Gly Ile
1 5

35 <210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR1 de TRA específica para epítipo de pp65

<400> 68
Thr Ser Ile Asn Asn
1 5

45 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> CDR2 de TRA específica para epítipo de pp65

<400> 69
Ile Arg Ser Asn Glu Arg Glu
55 1 5

60 <210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de TRB específica para epítipo de pp65

65 <400> 70
Ser Glu His Asn Arg
1 5

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> CDR2 de TRB específica para epítipo de pp65

<400> 71
10 Phe Gln Asn Glu Ala Gln
1 5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar uno o dos ácidos nucleicos que codifican la construcción de la cadena alfa (TRA) del receptor de células T (TCR) y la construcción de la cadena beta de TCR (TRB) de una construcción de TCR específica para un epítipo de un antígeno definido presentado en un MHC humano, que comprende
- 5 (a) estimular células T aisladas de un donante humano con células presentadoras de antígeno profesionales humanas que presentan epítipos de dicho antígeno definido, para enriquecer células T específicas de antígeno; y
- (b) poner en contacto dichas células T enriquecidas en células T específicas de antígeno de la etapa (a) con una biblioteca de células, en la que cada célula expresa un único alelo de MHC humano, en el que la biblioteca
- 10 comprende células que expresan todos los alelos de MHC I o MHC II presentes en el donante, y en la que las células de dicha biblioteca presentan epítipos de dicho antígeno definido; y
- (c) seleccionar células T activadas por dicho contacto; y
- (d) aislar los ácidos nucleicos que codifican las cadenas alfa de TCR y beta de TCR del TCR de dichas células T.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el MHC es MHC I, en el que la biblioteca de células comprende preferiblemente células K562 que expresan MHC I.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el procedimiento comprende además optimizar la secuencia, en el que dicha optimización consiste en
- 20 • optimizar el uso de codones de la TRA y TRB y/o
- combinar regiones variables humanas con regiones constantes murinas o regiones constantes murinas mínimas y/o
- maduración por afinidad de las secuencias de TCR y/o
- generación de moléculas receptoras solubles que contienen las regiones variables de los genes de las cadenas
- 25 TRA y TRB y/o
- fusionar TRA y TRB a través de un conector genético para proporcionar un único cassette transgénico que codifica ambas cadenas de una construcción de TCR funcional o preparar una construcción de TCR de cadena única,
- generar ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden las regiones variables de los genes de las cadenas TRA y TRB, opcionalmente, que codifican además dominios de anticuerpos.
- 30 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido nucleico es un vector que comprende las TRA y TRB unidas operativamente a un promotor adecuado para la expresión en células T, en el que el vector se selecciona del grupo que comprende un vector γ -retroviral, un vector lentiviral y un vector basado en transposones.
- 35 5. Procedimiento para preparar una célula huésped que expresa una construcción de TCR específica para un epítipo de un antígeno definido presentado en un MHC, que comprende llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y expresar dichos ácidos nucleicos que codifican las TRA y TRB en la célula huésped.
- 40 6. Procedimiento para identificar un epítipo capaz de ser presentado por un MHC en un antígeno definido, que comprende llevar a cabo las etapas (a) - (d) de la reivindicación 1 e identificar el epítipo capaz de activar células T transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las TRA y TRB aisladas que constituyen la construcción de TCR, en el que el epítipo se prepara opcionalmente en forma de péptido o ácido nucleico.
- 45 7. Ácido nucleico que codifica una TRA y/o TRB de una construcción de TCR específico para un epítipo en complejo con un MHC I humano, en el que el epítipo es un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 restringida a HLA-B*15:01, que comprende la SEQ ID NO: 1, en el que la TRA comprende una CDR3 que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y/o en la que la TRB comprende una CDR3 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene solo una o dos sustituciones conservadoras en SEQ ID NO: 6.
- 50 8. Ácido nucleico, según la reivindicación 7, en el que la región variable de la TRA tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; y/o en el que la región variable de TRB tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.
- 55 9. Célula huésped que comprende un ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que codifica la TRA y TRB de una construcción de TCR específica para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16, y que expresa dicho TCR, en la que la célula huésped preferiblemente es una célula T CD8+.
- 60 10. Proteína codificada por el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que comprende preferiblemente TRA y TRB.
- 65 11. Composición farmacéutica que comprende la proteína, según la reivindicación 10, la célula T recombinante, según la reivindicación 9, o el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la que la construcción de TCR comprende las TRA y TRB.

- 5 12. Composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar en el tratamiento de un paciente infectado con el virus del papiloma humano 16, en la que la construcción de TCR es específica para un epítipo de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 en complejo con HLA-B*15:01 y en la que el paciente es positivo en HLA-B*15:01.
- 10 13. Ácido nucleico que codifica un fragmento de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consiste en un epítipo capaz de ser reconocido por la construcción de TCR de la célula T, según la reivindicación 9, en el que el epítipo E5 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47, 51 y 52.
- 15 14. Fragmento peptídico de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consiste en un epítipo, en el que el epítipo es capaz de ser reconocido por la construcción de TCR de la célula T, según la reivindicación 9, en el que el epítipo E5 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47, 51 y 52.
- 20 15. Composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico, según la reivindicación 13, o el péptido, según la reivindicación 14.
- 25 16. Composición farmacéutica que comprende
a) un ácido nucleico que codifica un fragmento de oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consiste en un epítipo o
b) un fragmento peptídico de la oncoproteína E5 del virus del papiloma humano 16 que tiene una longitud de hasta 40 aminoácidos que consisten en un epítipo,
30 en la que el epítipo es capaz de ser reconocido por la construcción de TCR de la célula T, según la reivindicación 9, en la que el epítipo de E5 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 45, 47, 49, 51 y 52, para usar en la prevención de la infección con el virus del papiloma humano 16 en un sujeto, o para usar en el tratamiento de un paciente infectado con el virus del papiloma humano 16, en el que el sujeto o paciente es positivo en HLA-B*15:01.

Fig. 1

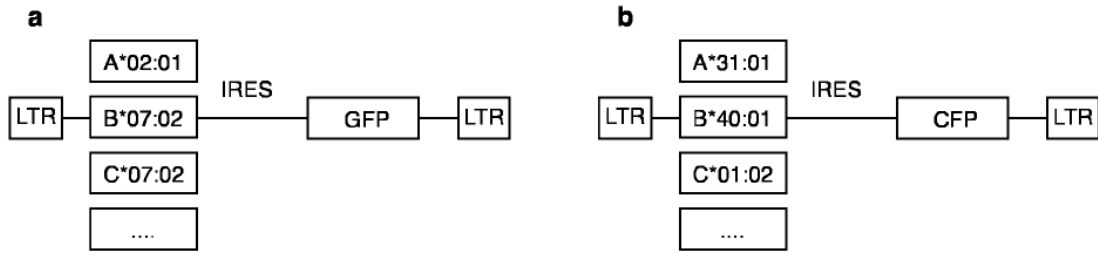


Fig. 2

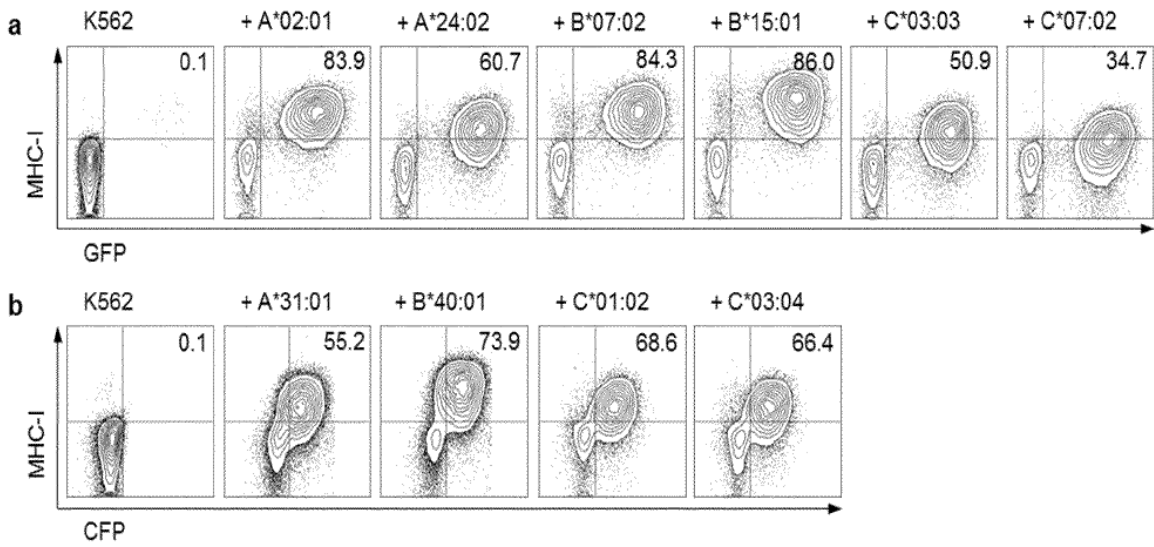


Fig. 3

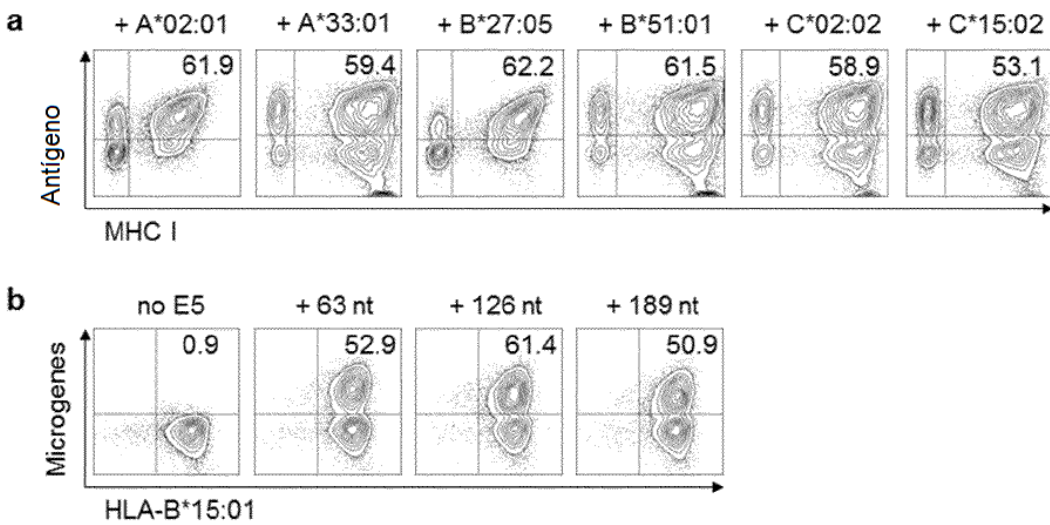


Fig. 4

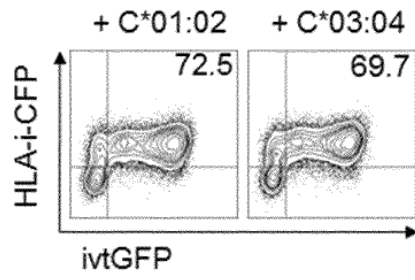


Fig. 5

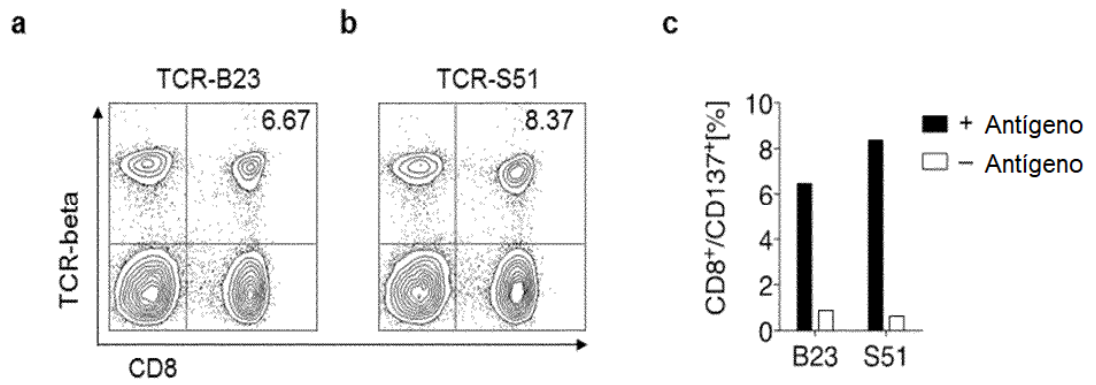


Fig. 6

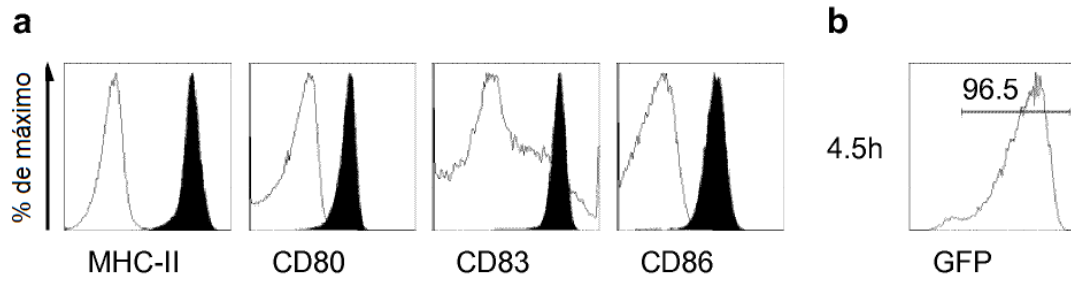


Fig. 7

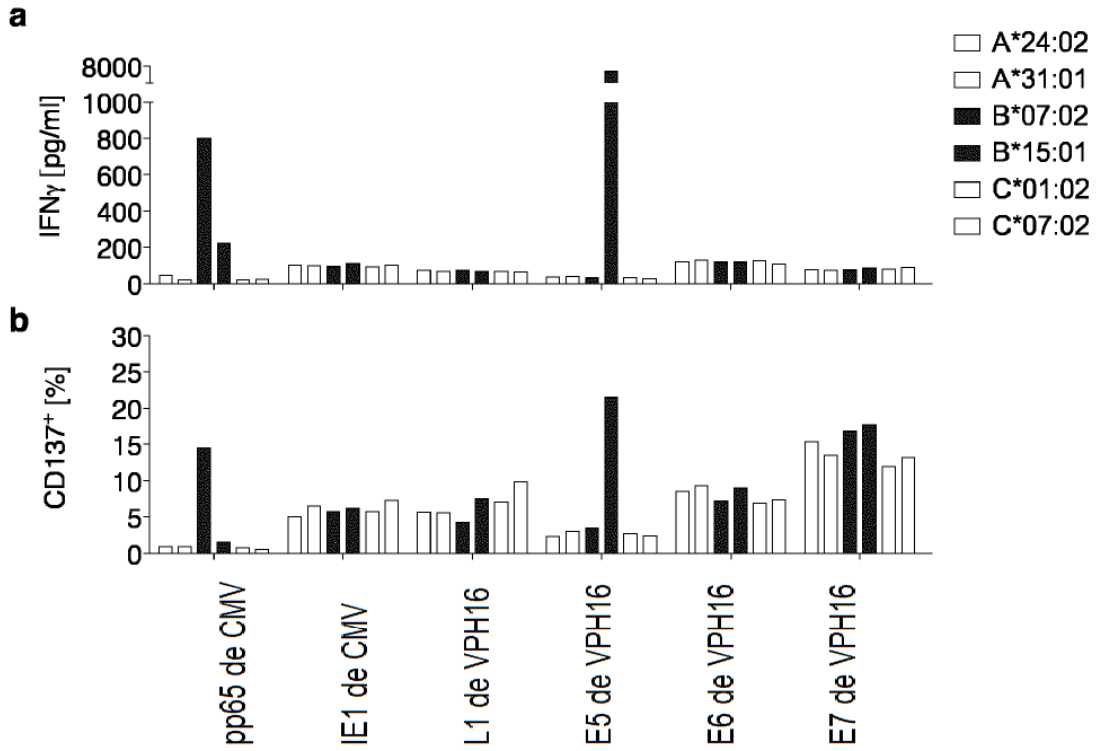


Fig. 8

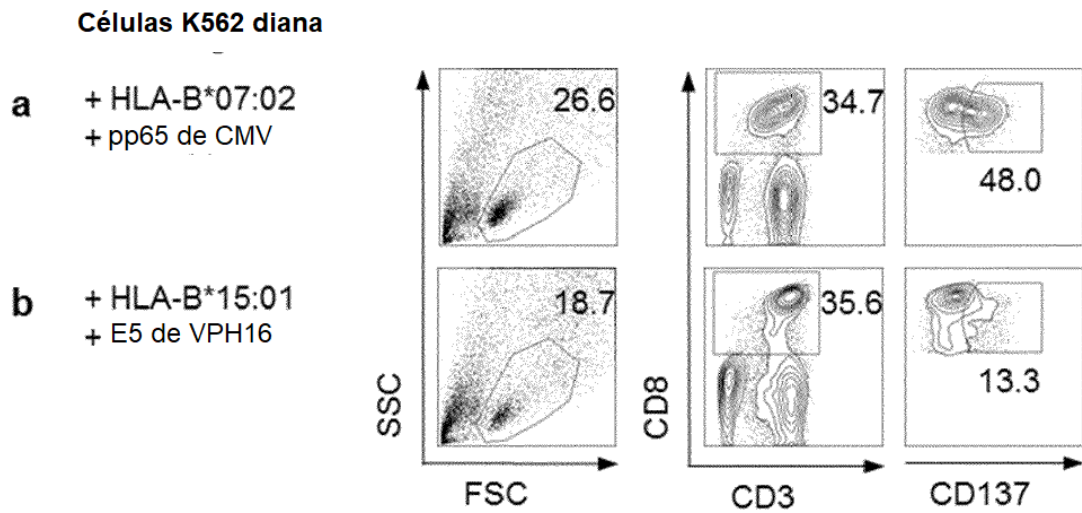


Fig. 9

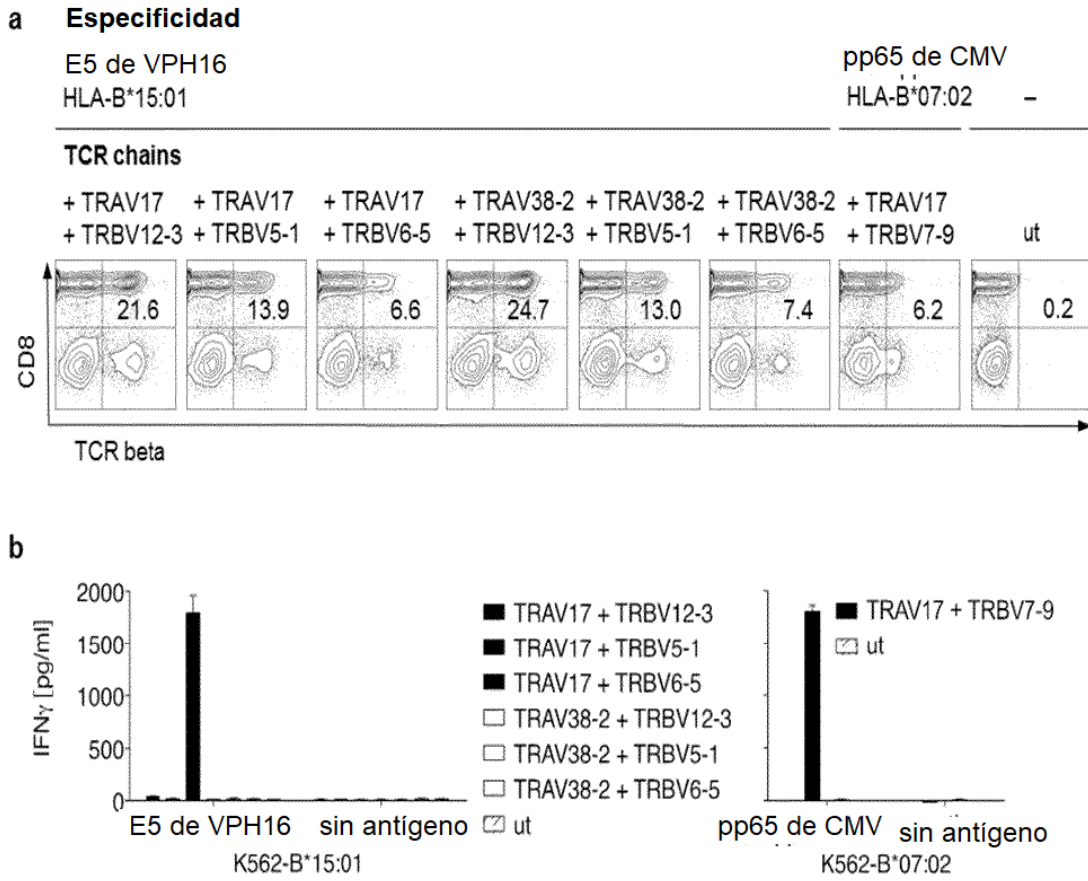


Fig. 10

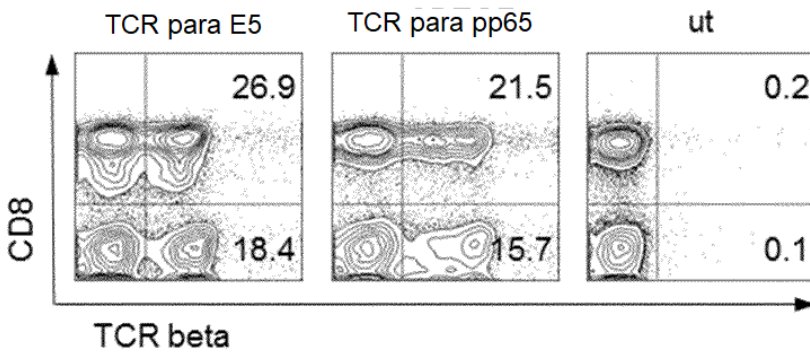


Fig. 11

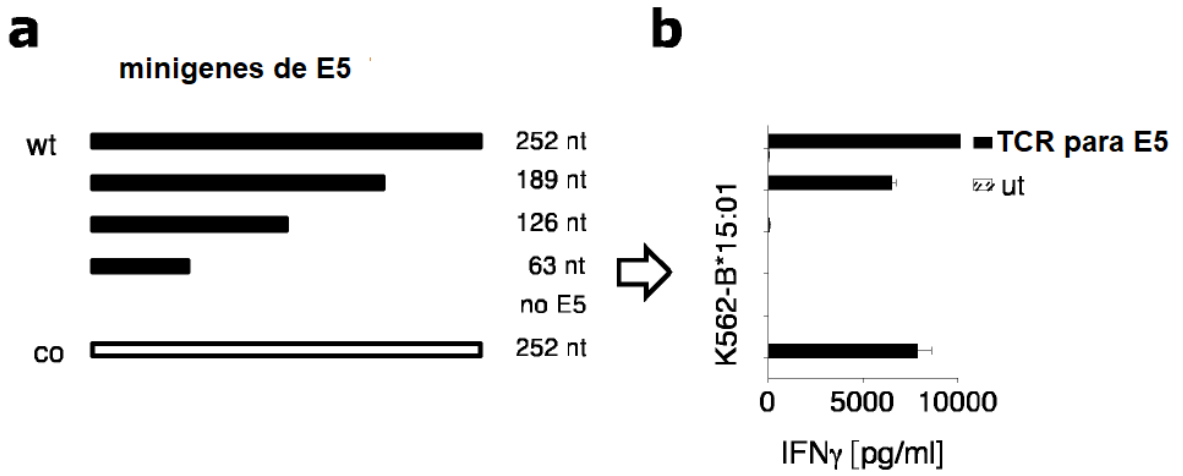


Fig. 12

