

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 973 064**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/725 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2014 E 19180239 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3572423**

(54) Título: **Receptores de células T frente al virus del papiloma humano 16 E6**

(30) Prioridad:

15.07.2013 US 201361846167 P

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

18.06.2024

(73) Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6701 Rockledge Drive, Suite 700, MSC
7788
Bethesda, Maryland 20892-7788, US**

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 064 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de células T frente al virus del papiloma humano 16 E6

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/846,167, presentada el 15 de julio de 2013. Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de acuerdo con los números de proyecto ZIABC011477 y BC010984-5 por parte de los Institutos nacionales de salud, Instituto nacional del cáncer. El gobierno tiene ciertos derechos con respecto a la invención.

Antecedentes de la invención

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

20 Breve resumen de la invención

La invención se expone en el juego adjunto de reivindicaciones.

25 Una realización de la invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica para el virus del papiloma humano (VPH) 16 E6, en el que el TCR comprende una región variable humana y una región constante murina, y en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3-8.

30 Otra realización de la invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un TCR que tiene especificidad antigénica para HPV 16 E6, en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

35 Otra realización de la invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una parte funcional de un TCR que tiene especificidad antigénica para HPV 16 E6, en el que la parte funcional se une específicamente a HPV 16 E6 y comprende las secuencias de aminoácidos de

40 (i) SEQ ID NO: 3-8;

(ii) SEQ ID NO: 9 y 10; o

45 (iii) SEQ ID NO: 11 y 12.

En otra realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en la que la proteína comprende:

50 (i) una primera cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8;

55 (ii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o

(iii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

60 La invención proporciona además células huésped aisladas que comprenden cualquiera de los vectores de expresión recombinante de la invención, y una población de células que comprende al menos una de dichas células huésped. La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i) cualquiera de los vectores de expresión recombinantes de la invención, dicha célula huésped, o dicha población de células, y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

65 La invención proporciona además cualquiera de los vectores de expresión recombinantes de la invención, las

células huésped de la invención, la población de células de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o prevención de una afección en un mamífero, donde la afección es cáncer, infección por VPH 16, o premalignidad VPH-positiva.

5 **Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos**

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

10 Las figuras 2A y 2B son gráficos de barras que muestran interferón-gamma (IFN- γ) (pg/ml) secretado por linfocitos de infiltración tumoral (TIL) a partir de fragmentos (F) 2-14 de tumor 3809 (A), fragmentos 15-24 (B) de tumor 3809, o TIL de melanoma tras el cultivo conjunto con células dendríticas autólogas (DC) que se habían pulsado con VPH 15 16 E6 solo (barras blancas), VPH 16 E6 en combinación con anticuerpo anti-clase I (barras sombreadas sin rayas), VPH 16 E7 solo (barras no sombreadas con rayas), VPH 16 E7 en combinación con anticuerpo anti-clase I (barras sombreadas con rayas), gp100 (barras negras) u OKT3 (barras con líneas horizontales).

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

20 La figura 4A es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por linfocitos de sangre periférica (PBL) que no se transdijeron (sin transducir) (barras sin sombrear) o transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 (TCR de E6; barras sombreadas) tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con Péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 25 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH-18, células de control de melanoma, células de control de colangio, células 624 o células SiHa. La expresión de HLA-30 A2 y VPH-16 por cada célula diana se indica en la parte inferior de la figura 4A ("+" indica positivo para la expresión y "-" indica negativo para la expresión).

35 La figura 4B es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 40 16 E6, células SCC90, células CaSki, células 624, DMF/células 624 o células 4.7.20 pulsadas con péptidos de VPH 16 E7 sin anticuerpo (barras negras), con anticuerpo anti-MHC de clase I (barras grises), o anticuerpo anti-MHC de clase II (barras sin sombrear).

45 La figura 5 es un gráfico de barras que muestra IFN- γ (pg/ml) secretado por PBL positivos para CD8 sin transducir (barras sin sombrear sin rayas), PBL positivos para CD4 sin transducir (barras sin sombrear con rayas cruzadas) o PBL (positivos para CD8 (TCR de E6; barras sombreadas sin rayas) o positivos para CD4 (TCR de E6; barras sombreadas con rayas cruzadas)) que se transdijeron con una secuencia de nucleótidos que codificaba para SEQ 50 ID NO: 17 y 18 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7₁₁₋₁₉, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293-A2, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH, células de control de melanoma, células 624 o células SiHa.

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

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

Descripción detallada de la invención

- Una realización de la invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un receptor de células T (TCR), y porciones funcionales y variantes funcionales del mismo, que tiene especificidad antigénica para el virus del papiloma humano (VPH) 16 E6 y que comprende una región variable humana y una región constante murina. En una realización de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6₂₉₋₃₈.
- El VPH 16 es el subtipo de VPH que está más habitualmente asociado con estados malignos. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que VPH 16 provoca cáncer al menos parcialmente mediante las acciones de la oncoproteína E6, que desregula el control del ciclo celular. VPH 16 E6 se expresa de manera constitutiva en células cancerosas y no se expresa por tejidos humanos normales sin infectar. VPH 16 E6 se expresa en una variedad de cánceres humanos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva y pene.
- El TCR puede tener especificidad antigénica por cualquier proteína, polipéptido o péptido de VPH 16 E6. En una realización de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por una proteína de VPH 16 E6 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por un péptido de VPH 16 E6₂₉₋₃₈ que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de TIHDIILECV (SEQ ID NO: 2).
- En una realización, los TCR de la invención pueden reconocer VPH 16 E6 de una manera dependiente de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. "Manera dependiente de MHC de clase I", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR provoca una respuesta inmunitaria tras unirse a VPH 16 E6 dentro del contexto de una molécula de MHC de clase I. La molécula de MHC de clase I puede ser cualquier molécula de MHC de clase I conocida en la técnica, por ejemplo, moléculas de HLA-A. En una realización preferida de la invención, la molécula de MHC de clase I es una molécula de HLA-A2.
- Los TCR (incluidas las porciones funcionales y sus variantes funcionales) proporcionan muchas ventajas, incluso cuando son expresados por células utilizadas para la transferencia celular adoptiva. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que dado que VPH 16 E6 se expresa por células infectadas por VPH 16 de múltiples tipos de cáncer, los TCR de la invención (incluidas las partes funcionales y variantes funcionales de las mismas) proporcionan ventajosamente la capacidad de destruir células de múltiples tipos de cáncer asociado con VPH 16 y, por consiguiente, tratar o prevenir múltiples tipos de cáncer asociado con VPH 16. Adicionalmente, sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que dado que la proteína de VPH 16 E6 se expresa únicamente en células cancerosas, células infectadas por VPH 16 o células de estado premaligno positivo para VPH, los TCR (incluidas las partes funcionales y variantes funcionales de las mismas) se seleccionan ventajosamente como diana la destrucción de células cancerosas, células infectadas por VPH 16 o células de estado premaligno positivo para VPH, al tiempo que minimizan o eliminan la destrucción de células normales, no cancerosas, no infectadas por VPH y no premalignas positivas para VPH, reduciendo así, por ejemplo, minimizando o eliminando, la toxicidad. Además, los TCR pueden tratar o prevenir, ventajosamente, de manera satisfactoria, cánceres positivos para VPH que no responden a otros tipos de tratamiento tales como, por ejemplo, quimioterapia sola, cirugía o radiación. Adicionalmente, los TCR proporcionan un reconocimiento altamente ávido de VPH 16 E6, lo que puede proporcionar, ventajosamente, la capacidad de reconocer células tumorales no manipuladas (por ejemplo, células tumorales que no se han tratado con interferón-gamma, transfectado con un vector que codifica para uno o ambos de VPH 16 E6 y HLA-A2, pulsado con el péptido E6₂₉₋₃₈, o una combinación de los mismos).
- La frase "especificidad antigénica", tal como se usa en el presente documento, significa que el TCR puede unirse específicamente a, y reconocer de manera inmunológica, VPH 16 E6 con alta avidez. Por ejemplo, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por VPH 16 E6 si células T que expresan el TCR secretan al menos aproximadamente 200 pg/ml o más (por ejemplo, 200 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 5.000 pg/ml o más, 7.000 pg/ml o más, 10.000 pg/ml o más, o 20.000 pg/ml o más) de interferón gamma (IFN-γ) tras el cultivo conjunto con células diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con una baja concentración de péptido de VPH 16 E6 (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml o 5 ng/ml). Alternativa o adicionalmente, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por VPH 16 E6 si células T que expresan el TCR secretan al menos el doble de IFN-γ que el nivel de referencia de linfocitos de sangre periférica (PBL) sin transducir de IFN-γ tras el cultivo conjunto con células diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con una baja concentración de péptido de VPH 16 E6. Las células que expresan los TCR de la invención (incluidas las partes funcionales y variantes funcionales de las mismas) también pueden secretar IFN-γ tras el cultivo conjunto con células diana HLA-A2+ negativas para antígeno pulsadas con concentraciones superiores de péptido de VPH 16 E6.
- La invención proporciona un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un TCR

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

- 5 El TCR comprende dos cadenas de polipéptido, cada una de las cuales comprende una región variable humana que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR)1, una CDR2 y una CDR3 de un TCR. El TCR comprende una primera cadena de polipéptido que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena α), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena α), y una segunda cadena de polipéptido que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena β), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena β), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β). El TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
- El TCR de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. Con respecto a esto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α), SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β), o ambas SEQ ID NO: 9 y 10. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 10.

Los TCR pueden comprender además una región constante derivada a partir de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón. En una realización de la invención, los TCR comprenden además una región constante murina. Con respecto a esto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina), o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16. En una realización preferida, los TCR son TCRs quiméricos que comprenden tanto una región variable humana como una región constante murina.

En una realización de la invención, el TCR químérico puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el TCR puede comprender una cadena alfa que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α humana) y SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), una cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina), o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-10 y 15-16.

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

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

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

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

- El TCR humano puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el TCR puede comprender una cadena alfa que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α humana) y SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena α humana), una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β humana) y SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena β humana), o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-10 y 13-14.
- 5 El TCR humano puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. Cada una de la cadena α y la cadena β del TCR humano puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos.
- 10 Preferiblemente, la cadena α comprende la región variable humana de una cadena α y la región constante humana de una cadena α tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Una cadena α de este tipo puede aparecerse con cualquier cadena β de un TCR. Preferiblemente, la cadena β del TCR humano comprende la región variable humana de una cadena β y la región constante humana de una cadena β tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. El TCR humano puede comprender, por tanto, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o ambas de SEQ ID NO: 11 y 12. Preferiblemente, el TCR humano de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 y 12.
- 15 20 También se proporciona por la invención un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una parte funcional de un TCR en el que la parte funcional se une específicamente a HPV 16 E6 y comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8, SEQ ID NO: 9 y 10, o SEQ ID No: 11 y 12. El término "polipéptido" tal como se usa en el presente documento incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena individual de aminoácidos conectados mediante uno o más enlaces peptídicos.
- 25 Una parte funcional puede ser cualquier parte que comprende aminoácidos contiguos del TCR (o variante funcional del mismo) del que forma parte, siempre que la parte funcional se una específicamente a VPH 16 E6. El término "parte funcional" cuando se usa en referencia a un TCR (o variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR (o variante funcional del mismo), parte o fragmento que conserva la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo) del que forma parte (el TCR original o variante funcional original del mismo). Las partes funcionales abarcan, por ejemplo, las partes de un TCR (o variante funcional del mismo) que conservan la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6 (por ejemplo, de una manera dependiente de HLA-A2), o detectar, tratar o prevenir cáncer, hasta un grado similar, el mismo grado o hasta un grado superior, al TCR original (o variante funcional del mismo). En referencia al TCR original (o variante funcional del mismo), la parte funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10%, el 25%, el 30%, el 50%, el 68%, el 80%, el 90%, el 95%, o más, del TCR original (o variante funcional del mismo).
- 30 35 40 45 La parte funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo-terminal de la parte, o en ambos extremos terminales, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR original o variante funcional del mismo. De forma deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la parte funcional, por ejemplo, unirse específicamente al VPH 16 E6; y/o tener la capacidad de detectar el cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR parental o la variante funcional del mismo.
- 45 50 55 El polipéptido puede comprender una parte funcional de una o ambas de las cadenas α y β de los TCR o variante funcional de los mismos de la invención, tal como una parte funcional que comprende una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de la(s) región(es) variable(s) de la cadena α y/o cadena β de un TCR o variante funcional de los mismos de la invención. En una realización de la invención, el polipéptido comprende una parte funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), y 8 (CDR3 de cadena β).
- 55 60 65 El polipéptido puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR o variante funcional del mismo que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. Con respecto a esto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α), y SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena β).
- 60 65 El polipéptido puede comprender además una región constante derivada a partir de cualquier especie adecuada tal como, por ejemplo, ser humano o ratón. Con respecto a esto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena α humana), SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena β humana), SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena α murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena β murina), ambas de SEQ ID NO: 13 y 14, o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 13 y 14 o ambas de SEQ ID NO: 15 y 16.

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

- 5 El polipéptido puede comprender la longitud completa de una cadena α o β de uno de los TCR o variante funcional de los mismos descritos en el presente documento. Con respecto a esto, el polipéptido inventivo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, 17, o 18. Alternativamente, el polipéptido puede comprender las cadenas α y β de los TCR o variantes funcionales de los mismos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido inventivo puede comprender las secuencias de aminoácidos de ambos SEQ ID NO: 11 y 12 o ambos SEQ ID NO: 17 y 18, ambas SEQ ID NO: 11 y 18, o ambas SEQ ID NO: 17 y 12. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 11 y 12 o ambas de SEQ ID NO: 17 y 18.
- 10 15 La invención proporciona además un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por "proteína" quiere decirse una molécula que comprende una o más cadenas de polipéptido.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635

anticuerpo, etc. La cadena polipeptídica de un anticuerpo, o parte del mismo, puede existir como un polipéptido separado del anticuerpo recombinante. Alternativamente, la cadena de polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede existir como polipéptido que se expresa en marco (en tándem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede ser un polipéptido de cualquier anticuerpo o cualquier fragmento de anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento.

5 Se incluyen variantes funcionales de los TCR de la invención descritos en el presente documento. El término "variante funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a un TCR, polipéptido o proteína que tiene 10 identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con respecto a un TCR, polipéptido o proteína original, variante funcional que conserva la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína del que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, las variantes del TCR, polipéptido o proteína descrito en el presente documento (el TCR, polipéptido o proteína original) que conservan la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6 por el que el TCR original tiene especificidad antigénica o al que se une específicamente el polipéptido o 15 proteína original, hasta un grado similar, el mismo grado o hasta un grado superior, al TCR, polipéptido o proteína original. Haciendo referencia al TCR, polipéptido o proteína original, la variante funcional puede ser idéntica, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 30%, el 50%, el 75%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, al TCR, polipéptido o proteína original.

20 La variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución de aminoácido conservativa. En la técnica se conocen sustituciones de aminoácido conservativas, e incluyen sustituciones de aminoácido en las que se intercambia un aminoácido que tiene determinadas propiedades físicas y/o químicas por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades 25 químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácido conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido por otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

30 30 Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución de aminoácido no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácido no conservativa no interfiera con, o inhiba, la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución de aminoácido no conservativa potencia la actividad biológica de la variante funcional, de tal manera que se aumenta la actividad biológica de la variante funcional en comparación 35 con el TCR, polipéptido o proteína original.

40 El TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de tal manera que otros componentes del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian sustancialmente la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína. Con respecto a esto, el TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir, por ejemplo, esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, 17 o 18, ambas de SEQ ID NO: 11 y 12, ambas de SEQ ID NO: 17 y 18, ambas de SEQ ID NO: 11 y 18, o ambas de SEQ ID NO: 17 y 12. Además, por 45 ejemplo, los TCR (incluyendo variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas pueden consistir esencialmente en la(s) secuencia(s) de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, o ambas de SEQ ID NO: 9 y 10. Además, los TCR, (incluidas las variantes funcionales de las mismas) polipéptidos o proteínas de la invención consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena α), SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena α), SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena β), SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena β), y SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β).

50 Los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas las variantes funcionales de las mismas) pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los TCR, (o variantes funcionales de las mismas) polipéptidos o proteínas conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a VPH 16 E6; detectar cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH en un mamífero; o tratar o prevenir cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una longitud en el intervalo de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como una longitud de 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos. Con respecto a esto, los polipéptidos de la invención 55 también incluyen oligopéptidos.

60 Los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas las variantes funcionales de las mismas) de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se producen de manera natural. Tales aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano-carboxílico, norleucina, ácido α-amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina, β-

hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilanina, ciclohexilanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano-carboxílico, ácido α -aminociclohexano-carboxílico, ácido α -aminocicloheptano-carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

5 Los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas las variantes funcionales de las mismas) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse, por ejemplo, mediante un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

10 10 El TCR, el polipéptido y/o la proteína (incluidas sus variantes funcionales) pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos y las proteínas pueden producirse recombinantemente utilizando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento mediante métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold

15 15 Spring Harbor, NY 2012; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. A este respecto, los TCR (incluidas las variantes funcionales de las mismas), los polipéptidos y las proteínas son recombinantes.

20 20 Se incluyen, pero no se reivindican, conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas (incluyendo cualquiera de sus variantes funcionales), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes que son vectores virales, células huésped o poblaciones de células huésped. En la técnica se conocen conjugados, así como métodos de síntesis de conjugados en general (véanse, por ejemplo,

Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) y Kirin et al., Inorg Chem.44(15): 5405-5415 (2005)).

25 25 La invención proporciona vectores de expresión recombinantes, en el que los vectores de expresión recombinantes son vectores virales que comprenden un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento. Por "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento se incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y significa de manera general un polímero de ADN o ARN, que puede ser de cadena sencilla o de cadena doble,

30 30 sintetizarse u obtenerse (por ejemplo, aislarse y/o purificarse) a partir de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace entre nucleótidos natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido sin modificar. En una realización, el ácido nucleico comprende ADN complementario (ADNc). Generalmente se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción,

35 35 delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, en algunos casos puede ser adecuado, tal como se comenta en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

40 40 Los ácidos nucleicos son recombinantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas uniendo segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en el punto (i) anterior. Para los fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

45 45 Los ácidos nucleicos pueden construirse basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Green y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel et al., citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de diversas maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física

50 50 del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-

55 55 carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N⁶, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina.

60 60 Alternativamente, pueden adquirirse uno o más de los ácidos nucleicos de la invención a partir de empresas, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

65 65 El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas o variantes funcionales de los mismos descritos en el presente documento. En una realización de la invención, la secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la totalidad de SEQ ID NO: 31-36 (que codifican para CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β , CDR3 β ,

- respectivamente); la totalidad de SEQ ID NO: 31-33; la totalidad de SEQ ID NO: 34-36; ambas de SEQ ID NO: 19-20 (que codifican para regiones variables de cadenas α y β , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 23-24 (que codifican para región constante humana de cadenas α y β , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 25-26 (que codifican para región constante murina de cadenas α y β , respectivamente), la totalidad de SEQ ID NO: 19-20 y 23-24, la totalidad de SEQ ID NO: 19-20 y 25-26, ambas de SEQ ID NO: 21-22 (que codifican para cadenas α y β humanas, respectivamente), o ambas de SEQ ID NO: 27-28 (que codifican para cadenas α y β quiméricas, respectivamente). La secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, una cualquiera de SEQ ID NO: 19-28 y 31-36.
- 10 El ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos no natural. Una secuencia de nucleótidos puede considerarse "no natural" si no se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede estar optimizada para codones. Sin estar vinculados a una teoría o mecanismo concreto, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización del codón de la secuencia de nucleótidos puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifique el mismo aminoácido, pero que pueda ser traducido por un ARNt que esté más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficiencia de la traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias del ARNm que interferirían con la traducción, aumentando así la eficiencia de la traducción. En una realización de la invención, la secuencia de nucleótidos optimizada para codón puede comprender, consistir o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 38 (región variable de la cadena α), SEQ ID NO: 39 (región variable de la cadena β), o SEQ ID NO: 38 y 39.

El ácido nucleico también puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que hibride en condiciones estrictas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas hibrida preferentemente en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirán un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que sólo contiene unos pocos apareamientos erróneos dispersados, de una secuencia aleatoria que resultó tener unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, de 3-10 bases) que se apareaban con la secuencia de nucleótidos. Tales regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad hace que puedan distinguirse fácilmente. Las condiciones relativamente rigurosas incluirían, por ejemplo, condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, como las proporcionadas por aproximadamente 0,02-0,1 M de NaCl o su equivalente, a temperaturas de entre 50 y 70 °C aproximadamente. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poca o ninguna discordancia entre la secuencia de nucleótidos y la cadena molde o diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR inventivos (incluidas las partes funcionales y las variantes funcionales de las mismas). Generalmente se aprecia que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

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

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

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

nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinante pueden comprender enlaces entre nucleótidos que se producen de manera natural, que no se producen de manera natural o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces entre nucleótidos que no se producen de manera natural o alterados no dificultan la transcripción o replicación del vector.

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

10 Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas, por ejemplo, en Green y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Pueden prepararse constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para 15 contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Pueden derivarse sistemas de replicación, por ejemplo, a partir de ColEl, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

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

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

30 El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo variantes funcionales de los mismos), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a, o que se hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo variantes funcionales de los mismos). La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo, 35 se encuentra dentro de las habilidades habituales del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de las habilidades del experto. El promotor viral puede ser, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor que se encuentra en la repetición largo-terminal del virus de células madre murino.

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

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

55 Otra realización de la invención proporciona además una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de planta, animal, hongo o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente a partir de un organismo, por ejemplo, un 60 ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. En la técnica se conocen células huésped adecuadas e incluyen, por ejemplo, células *E. coli* DH5 α , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 α . Para los fines de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula de mamífero. Lo más preferiblemente, la célula huésped es una célula humana. Aunque la célula huésped puede ser de cualquier tipo celular, puede 65

proceder de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier fase de desarrollo, la célula huésped es preferiblemente un linfocito de sangre periférica (LPS) o una célula mononuclear de sangre periférica (CMSP). Más preferiblemente, la célula huésped es una célula T.

- 5 Para los fines en el presente documento, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T a partir de una línea de células T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida a partir de un mamífero. Si se obtiene a partir de un mamífero, la célula T puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o líquidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. Preferiblemente, 10 la célula T es una célula T humana. Más preferiblemente, la célula T es una célula T aislada a partir de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier fase de desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, células T doble positivas CD4⁺/CD8⁺, células T cooperadoras CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, células T CD4⁺, células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos de infiltración tumoral (TIL), 15 células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria centrales y células T de memoria efectoras), células T vírgenes, y similares.

La invención también proporciona una población de células que comprende al menos una célula huésped descrita en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinante, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. De forma alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, 20 en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonal, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de tal manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que 25 comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento.

En una realización de la invención, los números de células en la población pueden expandirse rápidamente. La expansión de los números de células T puede lograrse mediante cualquiera de varios métodos tal como se conoce en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 8.034.334; patente estadounidense 35 8.383.099; publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133; Dudley et al., J. Immunother., 26: 332-42 (2003); y Riddell et al., J. Immunol. Methods, 128: 189-201 (1990).

Se describe pero no se reivindica un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una parte funcional de cualquiera de los TCR (o variante funcional del mismo) descritos en el 40 presente documento. La parte funcional puede unirse específicamente al antígeno del cáncer, por ejemplo la parte funcional que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (CDR1 de la cadena α), 4 (CDR2 de la cadena α), 5 (CDR3 de la cadena α), 6 (CDR1 de la cadena β), 7 (CDR2 de la cadena β), 8 (CDR3 de la cadena β), SEQ ID NO: 9 (región variable de la cadena α), SEQ ID NO: 10 (región variable de la cadena β), o una combinación de las mismas, por ejemplo, 3-5; 6-8; 3-8; 9; 10; o 9-10. Más preferiblemente, la parte funcional 45 comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3-8 o SEQ ID NO: 9 y 10. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítopo que está formado por las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena alfa y CDR1-3 de la cadena beta). El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que se conoce en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isótipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo 50 puede ser monoclonal o polyclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que se produce de manera natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado a partir de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. De forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado genéticamente, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidez por la parte funcional del TCR (o variante funcional del mismo). De manera deseable, el anticuerpo es específico para la 55 parte funcional del TCR (o variantes funcionales de las mismas), de tal manera que hay reacción cruzada mínima con otros péptidos o proteínas.

En la técnica se conocen métodos de someter a prueba anticuerpos para detectar la capacidad de unirse a cualquier parte funcional o variante funcional del TCR e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, 60 tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición de competencia (véanse, por ejemplo, Janeway et al., citado a continuación, y publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1).

En la técnica se conocen métodos adecuados de producir anticuerpos. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma convencionales, por ejemplo, en Köhler y Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane 65 (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8^a ed.,

Garland Publishing, Nueva York, NY (2011)). De forma alternativa, otros métodos, como los métodos EBV-hibridoma (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión en vector de bacteriófago (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, se describen métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1.

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

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

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

30 También se divultan, pero no se reivindican, partes de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. La parte de unión a antígeno puede ser cualquier parte que tiene al menos un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

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

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

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

55 Los vectores de expresión recombinantes inventivos y las células huésped (incluidas sus poblaciones), todos ellos denominados colectivamente en lo sucesivo "materiales TCR inventivos", pueden formularse en una composición, como una composición farmacéutica. Con respecto a esto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes, y células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas) descritos en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas inventivas que contienen cualquiera de los materiales TCR inventivos pueden comprender más de un material TCR de la invención. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otro(s) fármaco(s) o agente(s) farmacéuticamente activo(s), tal como un agente quimioterápico, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente para el material de TCR de la invención particular en consideración. Tales portadores farmacéuticamente aceptables los conocen bien los

5 expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador estará determinada en parte por el material de TCR de la invención particular, así como 10 por el método particular usado para administrar el material de TCR de la invención. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las formulaciones adecuadas pueden incluir cualquiera de aquellas para administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal o interperitoneal. Puede usarse más de una vía para administrar los materiales de TCR de la invención, y en determinados casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

15 Preferiblemente, el material de TCR de la invención se administra mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina sérica humana.

20 A efectos de la invención, la cantidad o dosis (por ejemplo, números de células cuando el material de TCR de la invención es una o más células) del material de TCR de la invención administrado debe ser suficiente para provocar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica en el sujeto o animal a lo largo de un intervalo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención debe ser suficiente para unirse a un antígeno de cáncer, o detectar, tratar o prevenir cáncer en un periodo de desde aproximadamente 2 horas o más 25 largo, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de la administración. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo puede ser incluso más largo. La dosis estará determinada por la eficacia del material de TCR de la invención particular y el estado del animal (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

30 En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para los fines de la invención, un ensayo, que comprende comparar el grado en el que se someten células diana a lisis o se secreta IFN-γ por células T que expresan el TCR,(o variante funcional o parte funcional de las mismas) polipéptido o proteína tras la administración de una dosis dada de tales células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos a cada uno de los cuales se les administra una dosis diferente de las células T, puede usarse para determinar una dosis inicial 35 que va a administrarse a un mamífero. El grado en el que se someten células diana a lisis o se secreta IFN-γ tras la administración de una determinada dosis puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica.

40 La dosis del material de TCR de la invención también estará determinada por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material de TCR de la invención particular. Normalmente, el médico encargado decidirá la dosificación del material de TCR de la invención con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en consideración una variedad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de TCR de la invención que va a administrarse, vía de administración, y la intensidad del estado que está tratándose. En una realización en la que el material de TCR de la invención es una población de células, el número de células administradas por infusión puede variar, por 45 ejemplo, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células o más.

50 Un experto habitual en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR inventivos de la invención pueden modificarse de cualquiera de varias maneras, de tal modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de TCR de la invención se aumenta mediante la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR de la invención pueden conjugarse o bien directa o bien indirectamente a través de un puente a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, materiales de TCR de la invención, a restos de direccionamiento se conoce en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) y patente estadounidense 5.087.616. El término "resto de direccionamiento" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un receptor de superficie celular, 55 de tal manera que el resto de direccionamiento dirige la administración de los materiales de TCR de la invención a una población de células sobre cuya superficie se expresa el receptor. Los restos de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y cualquier otro ligando natural o no natural, que se unen a receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), etc.). El término "puente" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente o molécula que une los materiales de TCR de la invención al resto de direccionamiento. Un experto habitual en la técnica reconoce que sitios en los materiales de TCR de la invención, que no son necesarios para la función de los materiales de TCR de la invención, son sitios ideales para acoplar un puente y/o un resto de direccionamiento, siempre que el puente y/o resto de direccionamiento, una vez acoplado a los materiales de TCR de la invención, no interfiera con 60 la función de los materiales de TCR de la invención, es decir, la capacidad de unirse a VPH 16 E6; o de detectar, 65

tratar o prevenir cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas, vectores de expresión recombinante, células huésped o poblaciones de células de la invención pueden usarse en métodos de tratamiento o prevención de cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH. Sin estar limitados a una teoría particular, se cree que los TCR (y sus variantes funcionales) se unen específicamente al VPH 16 E6, de manera que el TCR (o polipéptido o proteína relacionados y sus variantes funcionales), cuando se expresa por una célula, es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra una célula diana que expresa el VPH 16 E6. Con respecto a esto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una afección en un mamífero, que comprende administrar al mamífero cualquiera de las composiciones farmacéuticas, vectores de expresión recombinantes que son vectores virales que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas descritas en el presente documento, o cualquier célula huésped o población de células que comprenda un vector recombinante que codifique cualquiera de los TCR (y sus variantes funcionales), polipéptidos o proteínas descritas en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la afección en el mamífero, en la que la afección es cáncer, infección por VPH 16 o premalignidad VPH-positiva.

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

También se describe, pero no se reivindica, un método para detectar la presencia de una afección en un mamífero. El método comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con cualquiera de los TCR (y variantes funcionales de las mismas) polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células, anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas de la invención descritos en el presente documento, formando así un complejo, y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia del estado en el mamífero, en el que el estado es cáncer, infección por VPH 16 o estado premaligno positivo para VPH.

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

Para los fines del método de detección, el contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*.

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

A efectos de los productos de la invención para su uso en métodos terapéuticos, en los que se administran células o poblaciones de células huésped, las células pueden ser alogénicas o autólogas del mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas con respecto al mamífero.

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

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

El mamífero al que se refieren los productos inventivos para su uso en métodos terapéuticos puede ser cualquier mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, tal como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Lagomorpha, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnivora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). Se prefiere más que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluyendo equinos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden de primates, cébidos o simoides (monos) o del orden Anthropoids (seres humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

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

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

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

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

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

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

Tabla A

TRAV	TRAJ	Colonias	TRBV	TRBJ	TRBD	Colonias
TRAV35*02	TRAJ41*01	4	TRBV7-6*01	TRBV2-3*01	TRBD1*01	8
TRAV10*01	TRAJ44*01	3	TRBV14*01	TRBJ1-6*01	TRBD1*01	1
TRAV5*01	TRAJ34*01	1				

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

Ejemplo 2

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

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

Ejemplo 3

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

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

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

Ejemplo 4

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

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

Ejemplo 5

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

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

Ejemplo 6

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

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

Ejemplo 7

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

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

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

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

Debe interpretarse que el uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y "al menos uno" y referentes similares en el

contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Debe interpretarse que el uso del término "al menos uno" seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") significa un elemento seleccionado de los elementos indicados

- 5 (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos indicados (A y B), a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "incluyendo, pero sin limitarse a") a menos que se indique lo contrario. Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento sirva simplemente como método abreviado de hacer referencia de manera individual a cada valor independiente que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara de manera individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno
- 10 de los ejemplos, o términos de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la invención y no suponga una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que ninguno de los elementos no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigenica para el virus del papiloma humano (VPH) 16 E6, en el que el TCR comprende una región variable humana y una región constante murina, y en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3-8; y opcionalmente en el que:
 - (i) el TCR tiene especificidad antigenica por VPH 16 E6₂₉₋₃₈ que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 - (ii) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 16;
 - (i) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18; o
 - (iv) el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.
2. Un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un TCR que tiene especificidad antigenica para HPV 16 E6, en el que el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8, TCR: opcionalmente en el que el TCR comprende:
 - (i) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10;
 - (ii) SEQ ID NO: 13 y 14; o
 - (iii) SEQ ID NO: 11 y 12.
3. Un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una parte funcional de un TCR que tiene especificidad antigenica para HPV 16 E6, en el que la parte funcional se une específicamente a HPV 16 E6 y comprende las secuencias de aminoácidos de
 - (i) SEQ ID NO: 3-8;
 - (ii) SEQ ID NO: 9 y 10; o
 - (iii) SEQ ID NO: 11 y 12.
4. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 3, en el que el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17 y 18.
5. Un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante es un vector viral que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en la que la proteína comprende:
 - (i) una primera cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8;
 - (ii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o
 - (iii) una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, opcionalmente en la que la proteína es una proteína de fusión y/o un anticuerpo recombinante.
6. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 5, en la que la proteína comprende una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, opcionalmente en la que la proteína es una proteína de fusión y/o un anticuerpo recombinante.
7. El vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el ácido nucleico comprende:

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

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

5 8. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 7, en el que: (i) en el que el ácido nucleico comprende además las secuencias de nucleótidos de (a) SEQ ID NO: 23 y 24 o (b) SEQ ID NO: 25 y 26; o (ii) en el que la secuencia de nucleótidos está optimizada para codón, en el que la secuencia de nucleótidos optimizada para codón comprende opcionalmente las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 38 y 39.

10 9. El vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el vector de expresión recombinante es un vector retroviral.

15 10. El vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el vector de expresión recombinante es un vector MSGV1.

20 11. El vector de expresión recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30.

25 12. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, opcionalmente en el que la célula es humana.

13. Población de células que comprende al menos una célula huésped según la reivindicación 12.

25 14. Una composición farmacéutica que comprende (i) el vector de expresión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la célula huésped de la reivindicación 12, o la población de células de la reivindicación 13, y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

30 15. El vector de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, la célula huésped de la reivindicación 12, la población de células de la reivindicación 13, o la composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento o prevención de una afección en un mamífero, en el que la afección es cáncer, infección por VPH 16, o premalignidad VPH-positiva,

35 opcionalmente en el que el estado es:

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

(ii) un cáncer positivo para VPH 16.

40

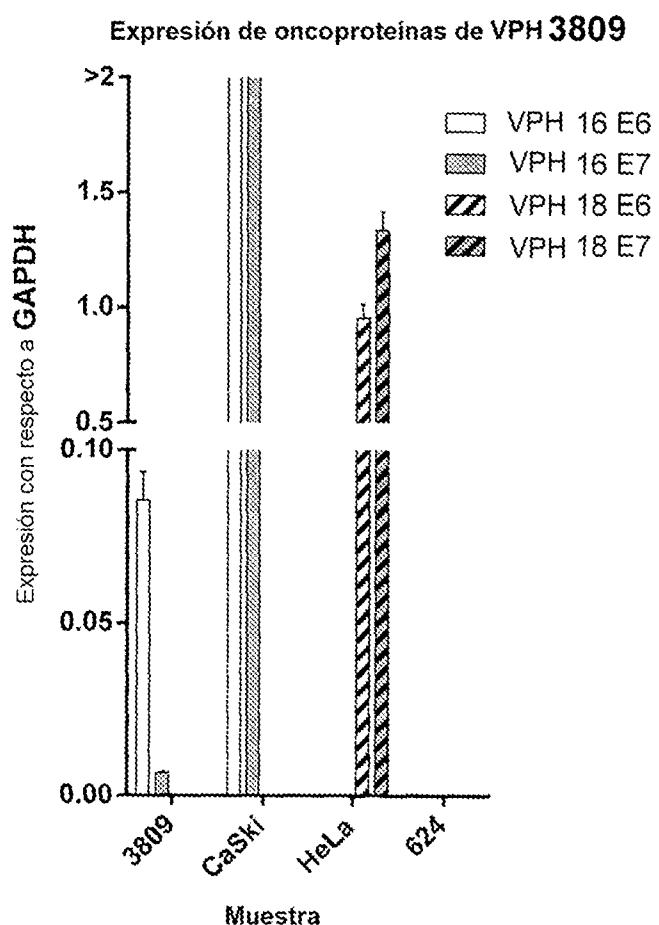


FIG. 1

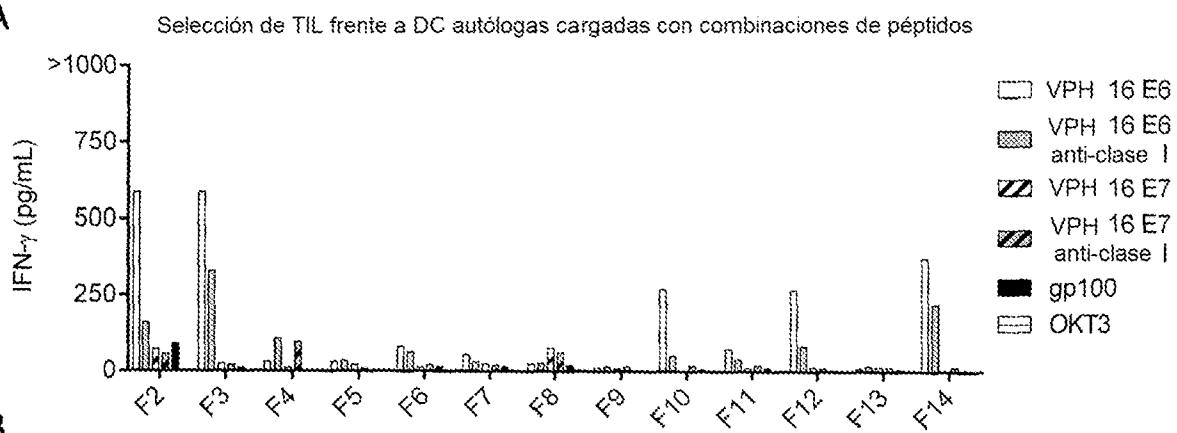
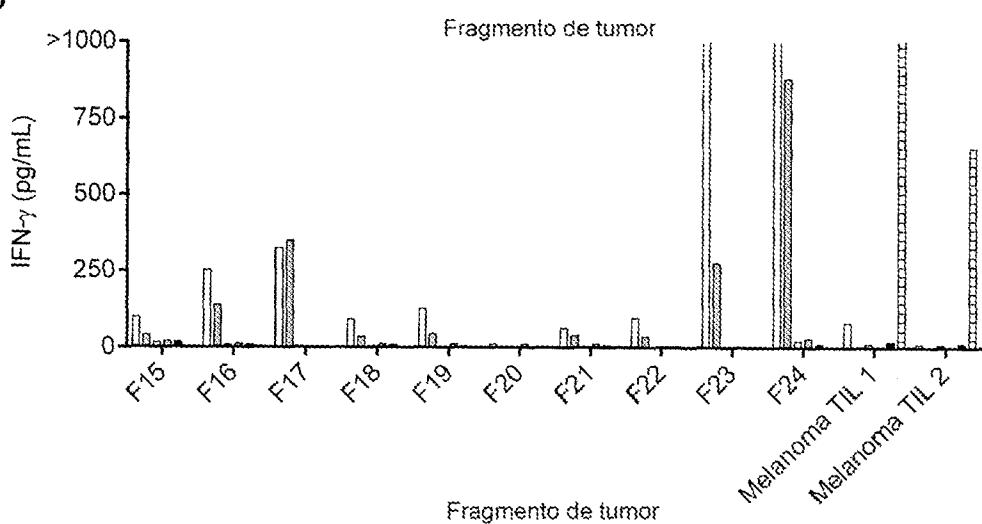
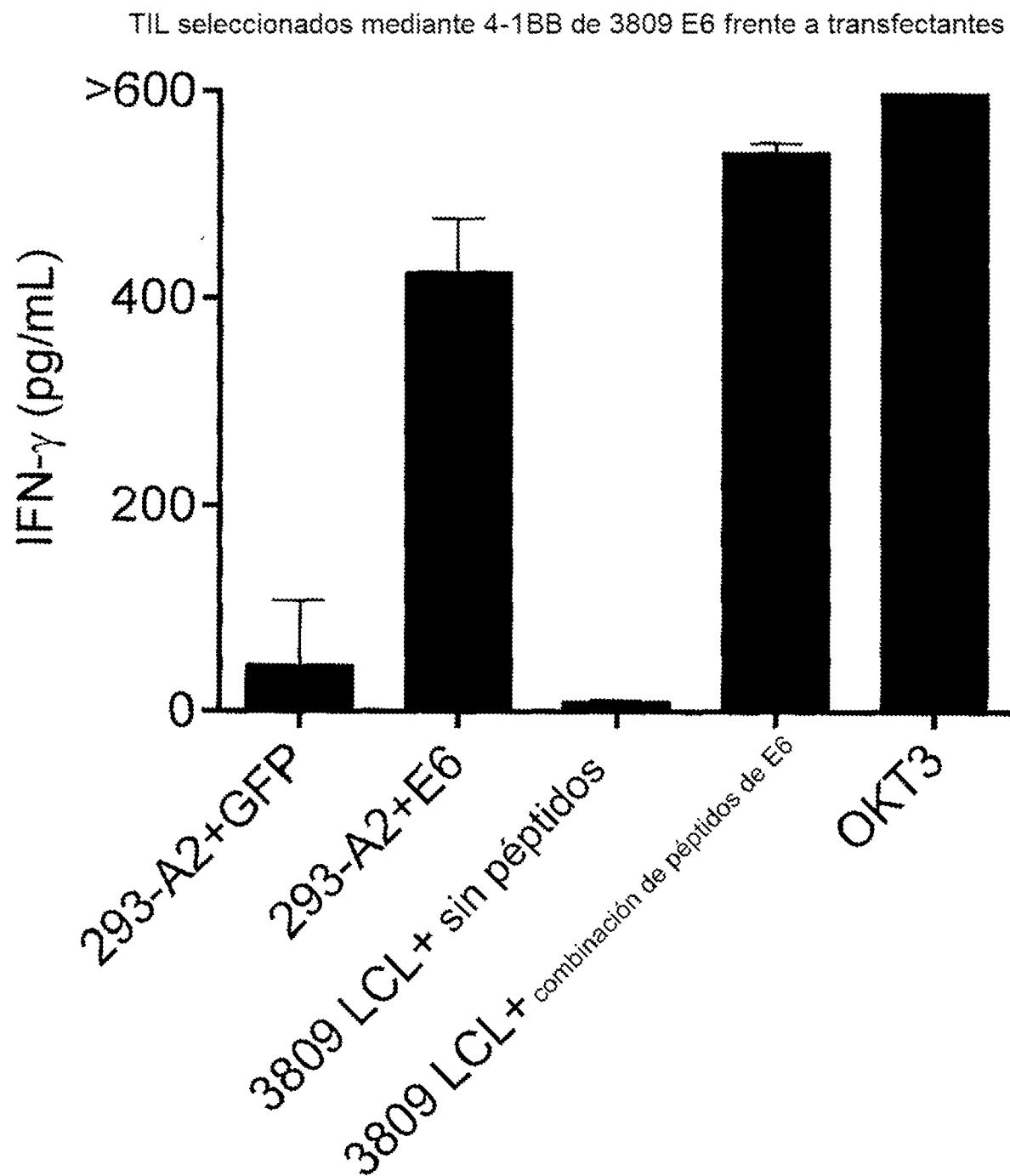
A**B**

FIG. 2



Célula diana + plásmido o combinación de péptidos

FIG. 3

ES 2 973 064 T3

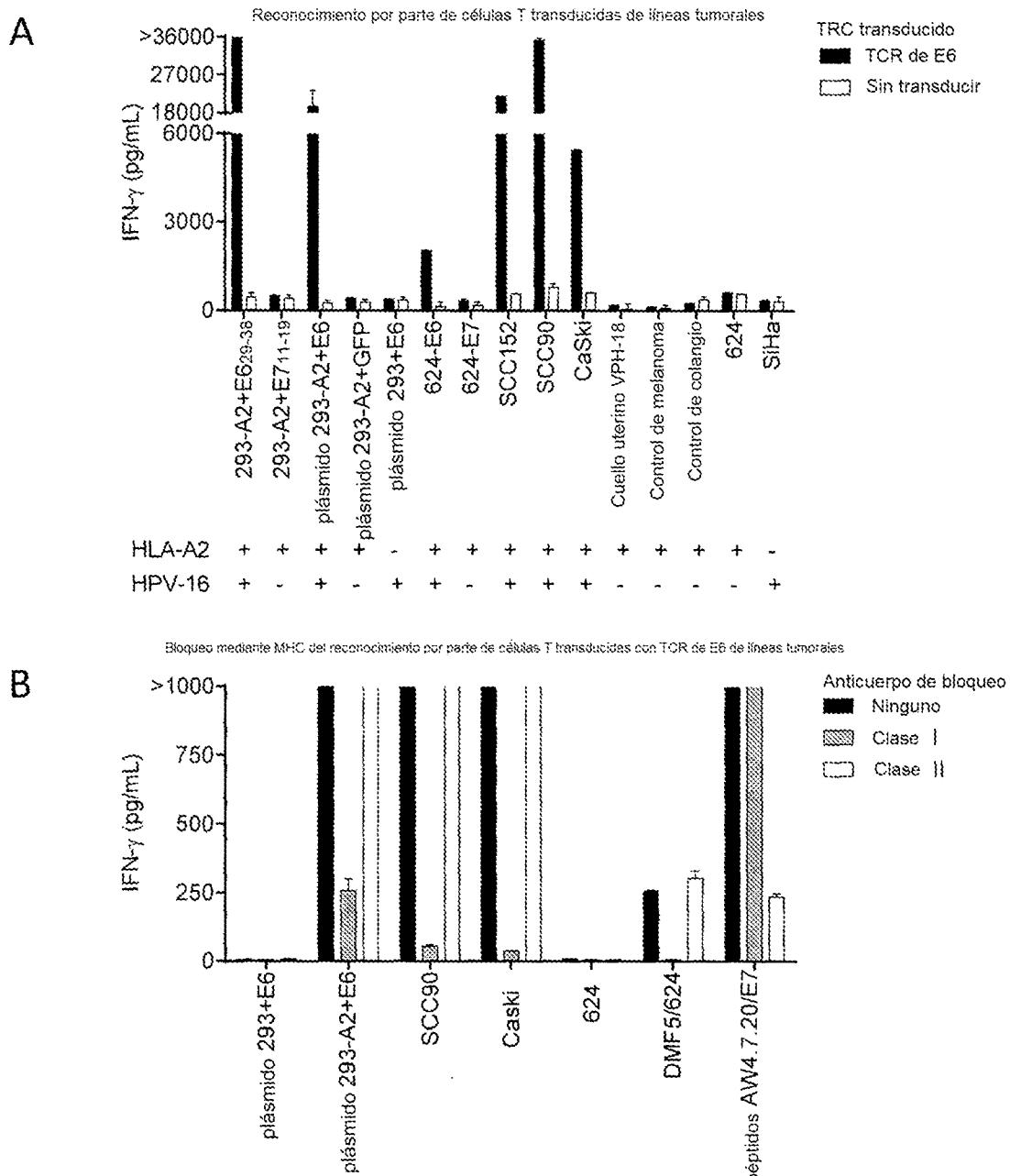


FIG. 4

ES 2 973 064 T3

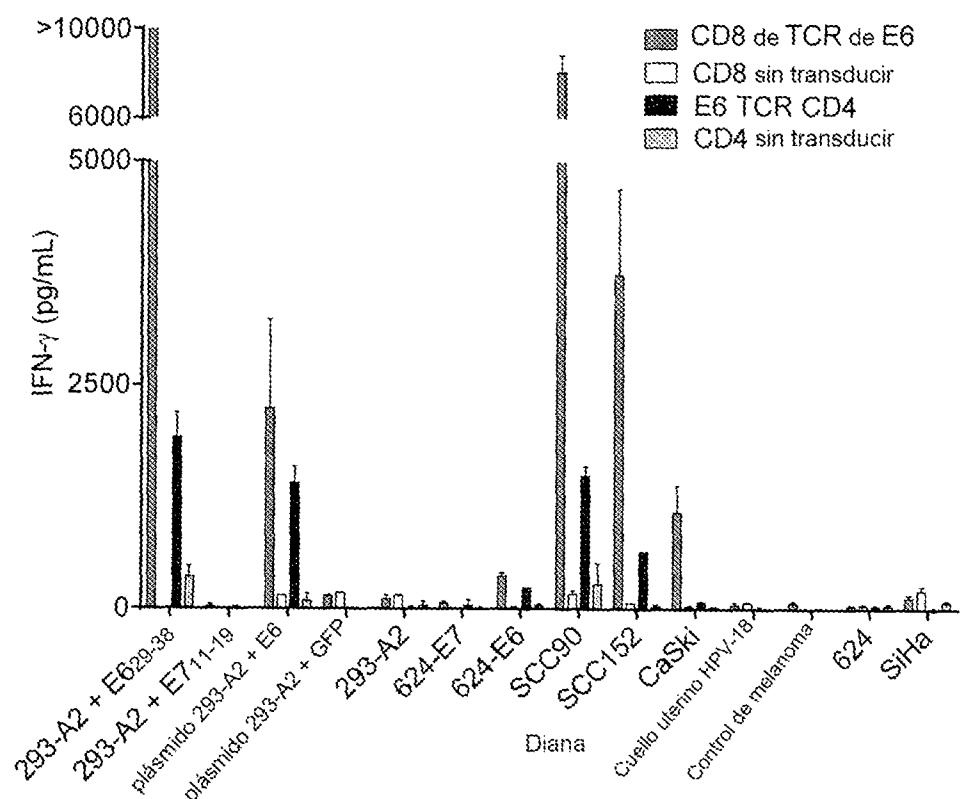


FIG. 5

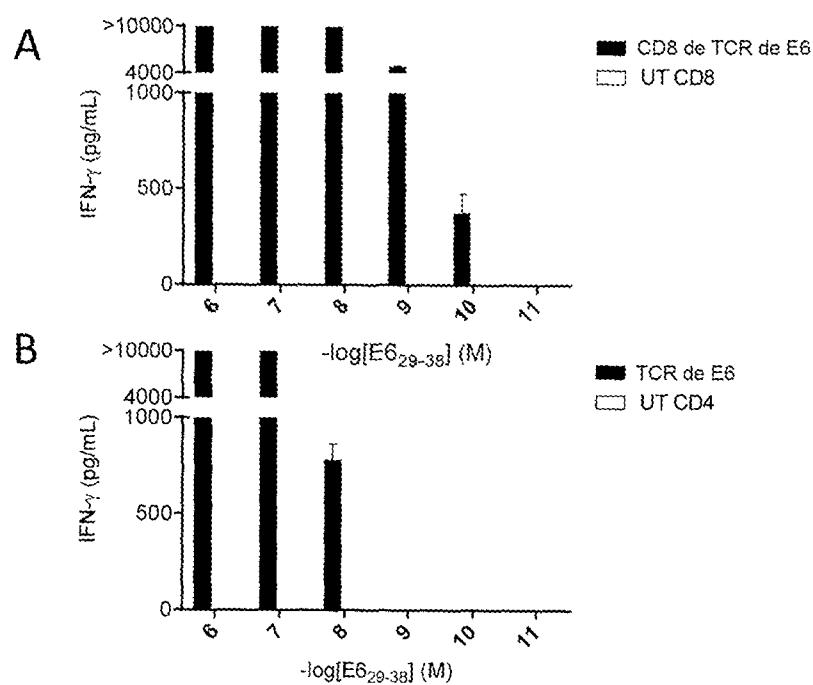


FIG. 6