

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:

**HINRICHS, 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

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.

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.

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.

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

(i) SEQ ID NO: 3-8;

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

(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:

(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.

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.

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 gliceraldehído 3-fosato deshidrogenasa (GAPDH) por células CaSki, células HeLa, células 624 o células de tumor 3809.

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

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

La figura 4A es un gráfico de barras que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado por linfocitos de sangre periférica (PBL) que no se transdujeron (sin transducir) (barras sin sombrear) o transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO: 17 y 18 (TCR de E6; barras sombreadas) tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con Péptido de VPH 16 E6<sub>29-38</sub>, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7<sub>11-19</sub>, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH-18, células de control de melanoma, células de control de colangio, células 624 o células SiHa. La expresión de HLA-A2 y VPH-16 por cada célula diana se indica en la parte inferior de la figura 4A ("+" indica positivo para la expresión y "-" indica negativo para la expresión).

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

La figura 5 es un gráfico de barras que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado por PBL positivos para CD8 sin transducir (barras sin sombrear sin rayas), PBL positivos para CD4 sin transducir (barras sin sombrear con rayas cruzadas) o PBL (positivos para CD8 (TCR de E6; barras sombreadas sin rayas) o positivos para CD4 (TCR de E6; barras sombreadas con rayas cruzadas)) que se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codificaba para SEQ ID NO: 17 y 18 tras el cultivo conjunto con células 293-A2 diana pulsadas con péptido de VPH 16 E6<sub>29-38</sub>, células 293-A2 pulsadas con péptido de VPH 16 E7<sub>11-19</sub>, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células 293-A2 transducidas con un plásmido que codifica para GFP, células 293-A2, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E7, células 624 transducidas con un plásmido que codifica para VPH 16 E6, células SCC152, células SCC90, células CaSki, células de cáncer de cuello uterino de VPH, células de control de melanoma, células 624 o células SiHa.

La figura 6A es un gráfico de barras que muestra IFN- $\gamma$  (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 E6<sub>29-38</sub> (-log M).

La figura 6B es un gráfico de barras que muestra IFN- $\gamma$  (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 E6<sub>29-38</sub> (-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 E6<sup>29-38</sup>.

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 E6<sup>29-38</sup> 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 E6<sup>29-38</sup>, 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 ( $\alpha$ ) de un TCR, una cadena beta ( $\beta$ ) de un TCR, una cadena gamma ( $\gamma$ ) de un TCR, una cadena delta ( $\delta$ ) 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.

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  $\alpha$ ), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena  $\alpha$ ), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), y una segunda cadena de polipéptido que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena  $\beta$ ), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ). El TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

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  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena  $\beta$ ), 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  $\alpha$  murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena  $\beta$  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 quimérico puede comprender una combinación de una región variable y una región constante. Con respecto a esto, el TCR puede comprender una cadena alfa que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena  $\alpha$  humana) y SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena  $\alpha$  murina), una cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena  $\beta$  humana) y SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena  $\beta$  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 quimérico puede comprender una cadena  $\alpha$  de un TCR y una cadena  $\beta$  de un TCR. Cada una de la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  del TCR quimérico pueden comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena  $\alpha$  comprende la región variable humana de una cadena  $\alpha$  y la región constante murina de una cadena  $\alpha$  tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Una cadena  $\alpha$  de este tipo puede aparearse con cualquier cadena  $\beta$  de un TCR. Preferiblemente, la cadena  $\beta$  del TCR quimérico comprende la región variable humana de una cadena  $\beta$  y la región constante murina de una cadena  $\beta$  tal como se expuso anteriormente. Con respecto a esto, el TCR quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. El TCR quimérico, 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 quimérico 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  $\alpha$  humana), SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena  $\beta$  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  $\alpha$  humana) y SEQ ID NO: 13 (la región constante de una cadena  $\alpha$  humana), una cadena beta que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena  $\beta$  humana) y SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena  $\beta$  humana), o la totalidad de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-10 y 13-14.

El TCR humano puede comprender una cadena  $\alpha$  de un TCR y una cadena  $\beta$  de un TCR. Cada una de la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  del TCR humano puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena  $\alpha$  comprende la región variable humana de una cadena  $\alpha$  y la región constante humana de una cadena  $\alpha$  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  $\alpha$  de este tipo puede aparearse con cualquier cadena  $\beta$  de un TCR. Preferiblemente, la cadena  $\beta$  del TCR humano comprende la región variable humana de una cadena  $\beta$  y la región constante humana de una cadena  $\beta$  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.

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.

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

La parte funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo-terminal de la parte, o en ambos extremos terminales, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR original o variante funcional del mismo. De 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.

El polipéptido puede comprender una parte funcional de una o ambas de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  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  $\alpha$  y/o cadena  $\beta$  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  $\alpha$ ), 4 (CDR2 de cadena  $\alpha$ ), 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), 6 (CDR1 de cadena  $\beta$ ), 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), y 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ).

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  $\alpha$ ), y SEQ ID NO: 10 (la región variable de una cadena  $\beta$ ).

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  $\alpha$  humana), SEQ ID NO: 14 (la región constante de una cadena  $\beta$  humana), SEQ ID NO: 15 (la región constante de una cadena  $\alpha$  murina), SEQ ID NO: 16 (la región constante de una cadena  $\beta$  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  $\alpha$  o  $\beta$  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  $\alpha$  y  $\beta$  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

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.

15

En una realización, la proteína puede comprender una primera cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8. De forma alternativa, la proteína puede comprender una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. La proteína puede comprender, por ejemplo, una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 9 y 13 o ambas de SEQ ID NO: 9 y 15, y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de ambas de SEQ ID NO: 10 y 14 o ambas de SEQ ID NO: 10 y 16. La proteína puede comprender, por ejemplo, una primera cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En este caso, la proteína puede ser un TCR. Alternativamente, si, por ejemplo, la proteína comprende una única cadena de polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12 o SEQ ID NO: 17 y 18, o si las cadenas de polipéptido primera y/o segunda de la proteína comprenden además otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifica para una inmunoglobulina o una parte de la misma, entonces la proteína puede ser una proteína de fusión. Con respecto a esto, la invención también 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 una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en el presente documento junto con al menos otro polipéptido. El otro polipéptido puede existir como polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como polipéptido que se expresa en marco (en tándem) con uno de los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento. El otro polipéptido puede codificar para cualquier molécula peptídica o proteica, o una parte de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula de MHC, una molécula de CD1, por ejemplo, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

25

30

35

40

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

45

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

55

60

La proteína puede ser un anticuerpo recombinante que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo recombinante" se refiere a una proteína recombinante (por ejemplo, modificada por ingeniería genética) que comprende al menos uno de los polipéptidos y una cadena de polipéptido de un anticuerpo, o una parte del mismo. El polipéptido de un anticuerpo, o parte del mismo, puede ser una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un fragmento Fc, Fab o F(ab)<sub>2</sub>' de un

65

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.

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

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

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

El TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de tal manera que otros componentes del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian sustancialmente la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína. Con respecto a esto, el TCR (o variante funcional del mismo), polipéptido o proteína puede consistir, por ejemplo, esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, 17 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 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  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 4 (CDR2 de cadena  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena  $\beta$ ), SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), y SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ).

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 también incluyen oligopéptidos.

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  $\alpha$ -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina,  $\beta$ -fenilserina,  $\beta$ -



hidroxifenilalanina, fenilglicina,  $\alpha$ -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido  $\alpha$ -aminociclopentano-carboxílico, ácido  $\alpha$ -aminociclohexano-carboxílico, ácido  $\alpha$ -aminocicloheptano-carboxílico, ácido  $\alpha$ -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico, ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico, homofenilalanina y  $\alpha$ -terc-butilglicina.

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.

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*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012; y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. A este respecto, los TCR (incluidas las variantes funcionales de las mismas), los polipéptidos y las proteínas son recombinantes.

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)).

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, 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, 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.

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*.

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

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 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$ , CDR3 $\beta$ ,

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  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 23-24 (que codifican para región constante humana de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente); ambas de SEQ ID NO: 25-26 (que codifican para región constante murina de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , 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  $\alpha$  y  $\beta$  humanas, respectivamente), o ambas de SEQ ID NO: 27-28 (que codifican para cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  químicas, respectivamente). La secuencia de nucleótidos puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, una cualquiera de SEQ ID NO: 19-28 y 31-36.

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  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 39 (región variable de la cadena  $\beta$ ), 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.

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.

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  $\alpha$ , la cadena  $\beta$  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  $\alpha$  y  $\beta$  químicas de SEQ ID NO: 17 y 18 con un ligador posicionado entre las mismas).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otra realización de la invención proporciona además una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de planta, animal, hongo o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente a partir de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. En la técnica se conocen células huésped adecuadas e incluyen, por ejemplo, células *E. coli* DH5 $\alpha$ , 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 $\alpha$ . 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

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<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>, por ejemplo, células Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos de infiltración tumoral (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria centrales y células T de memoria efectoras), células T vírgenes, y similares.

La invención también proporciona una población de células que comprende al menos una célula huésped 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  
20 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, en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en)  
25 que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonal, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de tal manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante tal como se describe en el  
30 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 epítipo que está formado por las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena alfa y CDR1-3 de la cadena beta). El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que se conoce en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que se produce de manera natural, por  
50 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 quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o aidez 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, 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  
60 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 (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8ª ed.,  
65

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, 4ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2012)). Se seleccionan fagos que codifican para una región variable con la especificidad deseada para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo reconstituido en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridoma, de tal manera que la célula secreta anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente, Huse et al., citado anteriormente, y patente estadounidense 6.265.150).

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

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

También se divulgan, 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')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

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

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

Los TCR, polipéptidos, proteínas (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%.

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 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 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.

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.

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 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.

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- $\gamma$  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 que va a administrarse a un mamífero. El grado en el que se someten células diana a lisis o se secreta IFN- $\gamma$  tras la administración de una determinada dosis puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica.

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

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

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

Se contempla que las composiciones farmacéuticas, 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 descritos 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, rhabdomioma 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 linfoblastoide (LCL) 3809 (células B que se han transformado usando virus de Epstein-Barr) cultivadas sin péptido, LCL 3809 cultivadas conjuntamente con una combinación de péptidos de VPH 16 E6, u OKT3. La combinación de péptidos incluyó péptidos de 15 meros con solapamientos de 11 aminoácidos que cubrían la secuencia completa de VPH 16 E6. Se midió IFN-γ. Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, los números expandidos de TIL eran reactivos frente a células 293-A2 transfectadas con E6 pero no frente a células 293-A2 transfectadas con GFP. Las células LCL 3809 cultivadas conjuntamente con la combinación de péptidos E6 demostraron reactividad mientras que las células LCL 3809 cultivadas conjuntamente sin péptidos no la demostró. Estudios de citometría de flujo mostraron que los números expandidos de células se unían a tetrámero HLA-A2/E6<sub>29-38</sub>.

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 quiméricas para dar una única secuencia de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos que codificaba para un péptido de picornavirus 2A posicionado entre las cadenas alfa y beta. Se optimizó en cuanto a codones la secuencia de nucleótidos combinada (opt) para la expresión en tejidos humanos para proporcionar un inserto de vector (SEQ ID NO: 29). Se clonó el inserto de vector en un vector de expresión de MSGV1 dando como resultado la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30 (TCR de E6). El TCR codificado por el vector comprendía una cadena alfa que comprendía una secuencia de aminoácidos que comprendía SEQ ID NO: 17 y una cadena beta que comprendía una secuencia de aminoácidos que comprendía SEQ ID NO: 18.

### Ejemplo 3

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

Se transdujeron linfocitos de sangre periférica (PBL) con el vector de expresión del Ejemplo 2 y se co-cultivaron con células diana 293-A2 pulsadas con el péptido HPV 16<sub>E629-38</sub>, células 293-A2 pulsadas con el péptido HPV 16<sub>E711-19</sub>, 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<sup>+</sup>VPH16<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>VPH16<sup>+</sup>, 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-E6<sub>29-38</sub> 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-E6<sub>29-38</sub> mediante citometría de flujo. Las células positivas para CD8 y negativas para CD8 se unieron ambas a tetrámero HLA-A2-E6<sub>29-38</sub>.

### 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 transdujeron (no transducidos) o se transdujeron con el vector de expresión del Ejemplo 2 y se co-cultivaron con células 293-A2 diana pulsadas con el péptido HPV 16<sub>E629-38</sub>, células 293-A2 pulsadas con el péptido HPV 16<sub>E711-19</sub>, 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<sup>+</sup> 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 E6<sub>29-38</sub>.

Los PBL CD8-positivos o CD4-positivos no se transdujeron (no transducidos) o se transdujeron con el vector de expresión del Ejemplo 2 y se co-cultivaron con células diana T2 pulsadas con concentraciones variables del péptido HPV 16<sub>E629-38</sub>. 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 E6<sub>29-38</sub>.

### Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra un método de tratamiento de cáncer VPH 16<sup>+</sup> en un paciente humano, que comprende administrar al paciente células T autólogas transducidas para expresar un TCR anti-VPH 16 E6<sub>29-38</sub> que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 18.

Los pacientes tendrán cáncer VPH-16<sup>+</sup> 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/m<sup>2</sup>/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 (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 de los ejemplos, o términos de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la invención y no suponga una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

20

## 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 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; y opcionalmente en el que:
  - (i) el TCR tiene especificidad antigénica por VPH 16 E6<sub>29-38</sub> 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 antigénica 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 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
  - (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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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,

opcionalmente en el que el estado es:

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

(ii) un cáncer positivo para VPH 16.

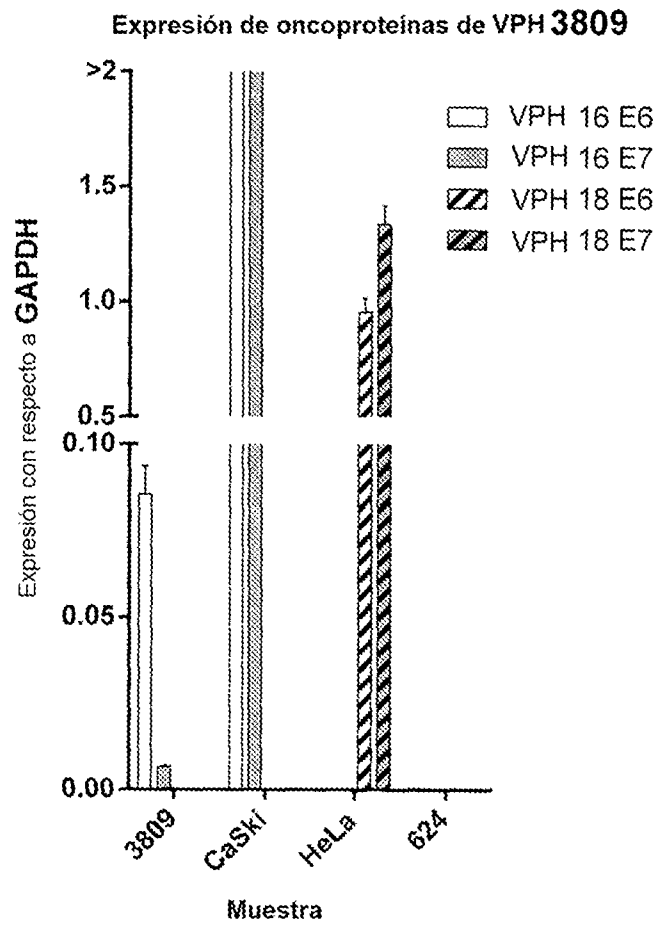


FIG. 1

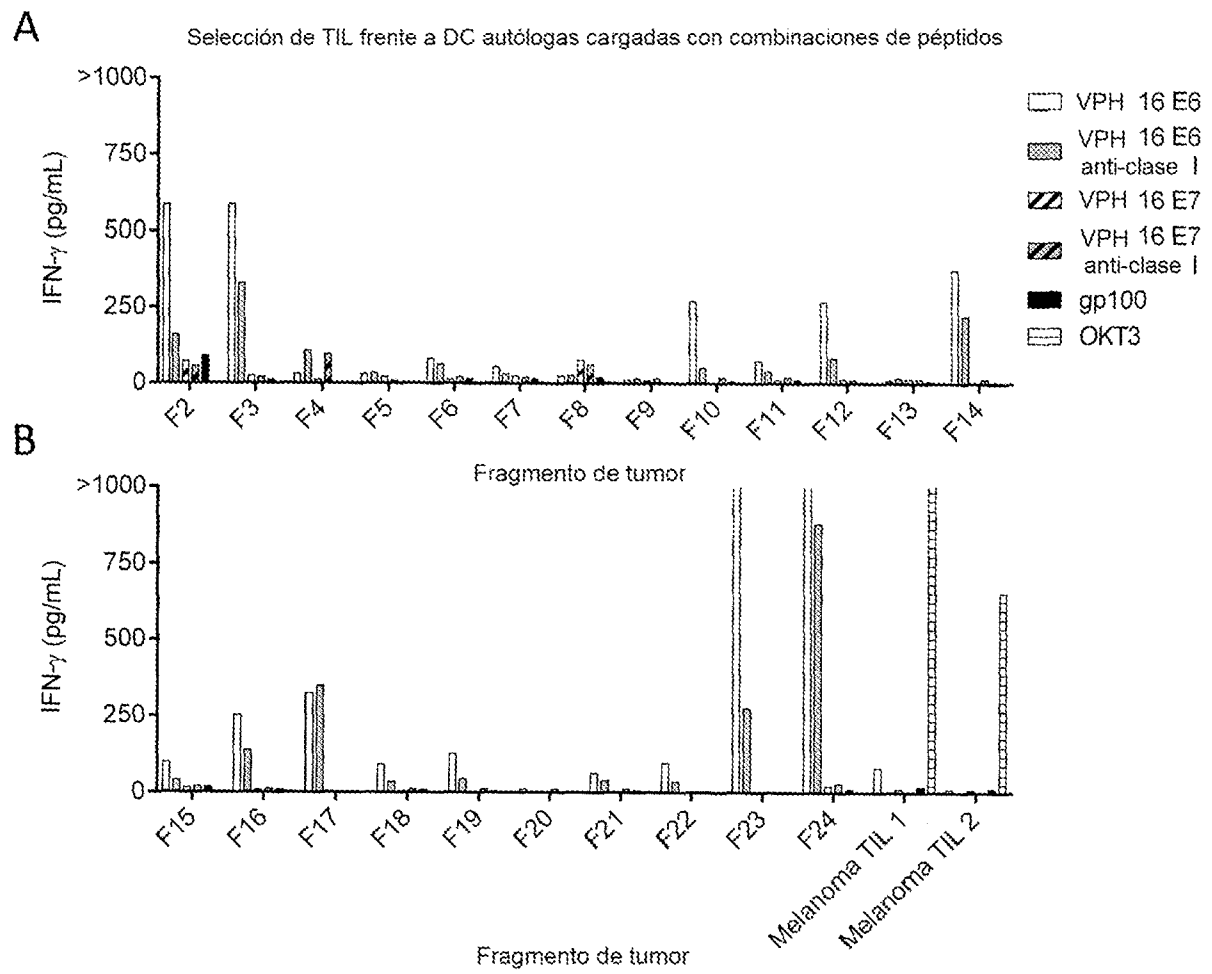
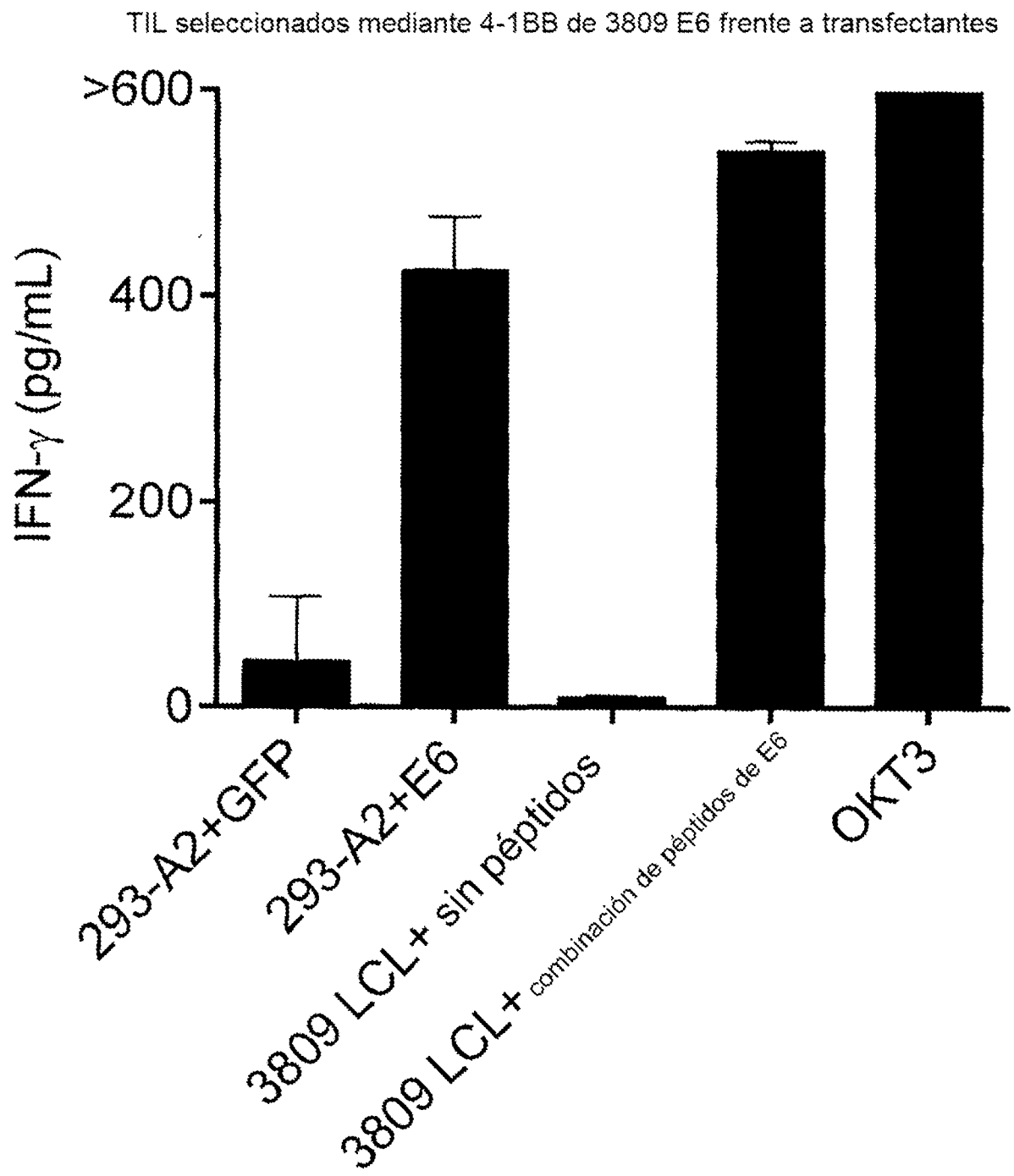


FIG. 2



Célula diana + plásmido o combinación de péptidos

FIG. 3



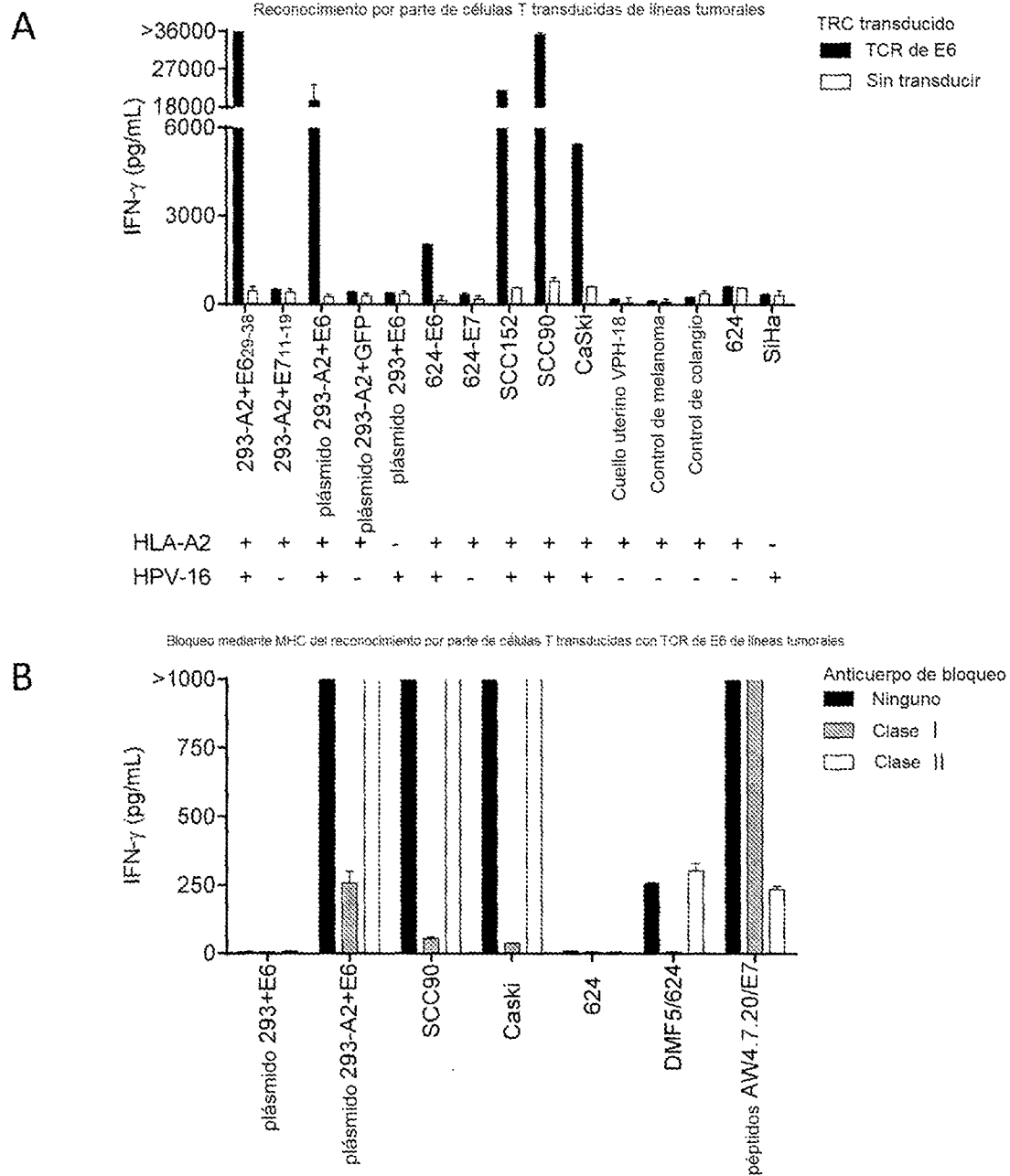


FIG. 4

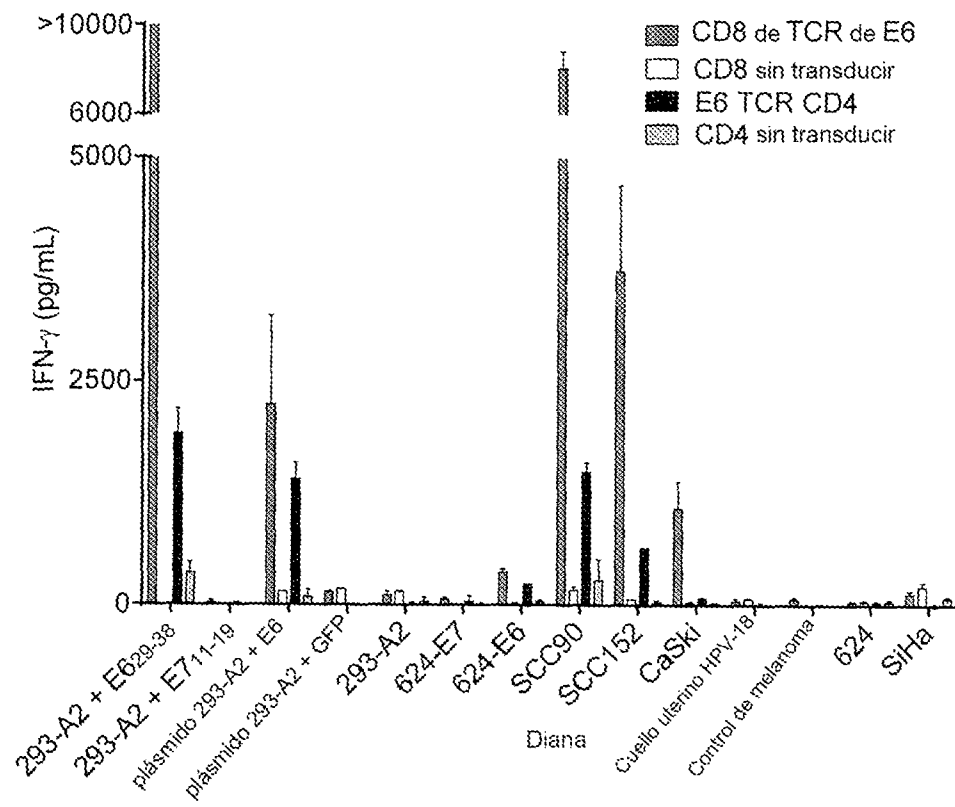


FIG. 5

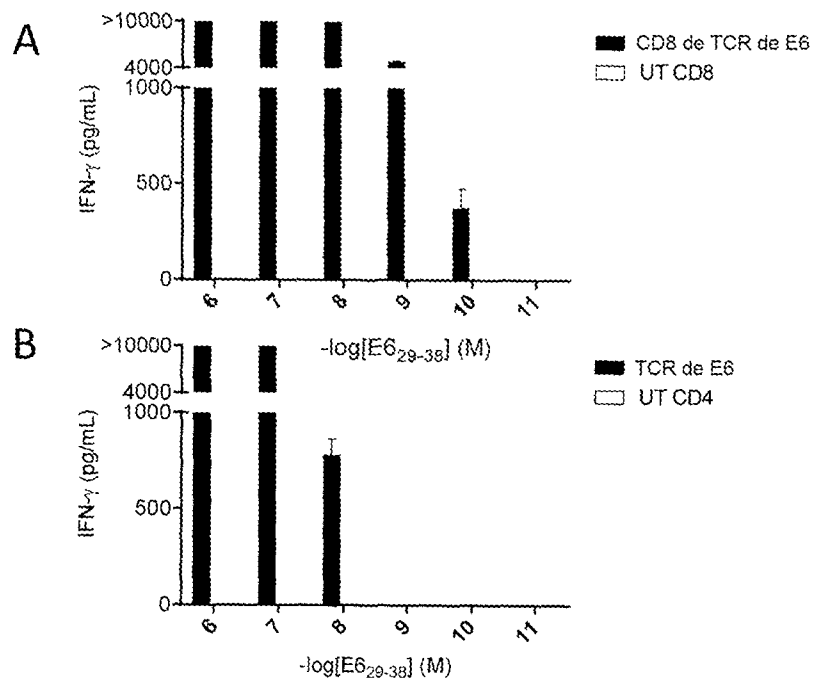


FIG. 6