

PROTEÍNAS DE UNIÓN QUE RECONOCEN AL ANTÍGENO HPV16 E7 Y USOS DE LAS MISMAS

Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud invoca el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 63/342.479, presentada el 16 de mayo de 2022; la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 63/317.326, presentada el 7 de marzo de 2022; y la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 63/277.901, presentada el 10 de noviembre de 2021; cuyos contenidos completos de cada una de dichas solicitudes se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

Antecedentes de la invención

El virus del papiloma humano (HPV) es un virus oncogénico que se encuentra en muchos tumores sólidos (por ejemplo, en los EEUU, cada año se diagnostican entre 20.000 y 30.000 cánceres asociados con HPV) y es responsable de una amplia variedad de formas malignas, inclusive más de un 25% de cánceres de cabeza y cuello, más de un 70% de cánceres orofaríngeos, más de un 90% de cánceres de cuello uterino y más de un 60% de cánceres de vagina, vulva y pene. Los antígenos de HPV, tales como las proteínas HPV E6 y EPV E7, son dianas convincentes por numerosas razones, que incluyen 1) las proteínas del HPV dirigen la tumorigénesis y son esenciales para la supervivencia de las células cancerosas, 2) las proteínas del HPV se expresan en todas las células tumorales, por lo cual dan como resultado una expresión diana homogénea y 3) las proteínas del HPV no se expresan en los tejidos sanos vitales, con lo cual se evita la toxicidad en los tejidos sanos cuando se busca como diana al HPV. Los datos clínicos iniciales de una terapia con células T-TCR dirigida a antígenos del HPV han demostrado una reducción de los tumores e índices de respuesta objetiva en el 50% de los pacientes (6 de 12 pacientes) tratados en un ensayo en fase 1 (ensayo NCT02858310). El veinticinco por ciento (3 de 12) de los pacientes demostraron una regresión completa de uno o más tumores. Existe la necesidad de desarrollar una inmunoterapia de TCR específica del HPV, tal como para tratar aquellos trastornos caracterizados por la expresión de un antígeno del HPV.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de proteínas de unión, inclusive receptores de células T (TCR), que reconocen al antígeno HPV16 E7¹¹⁻¹⁹.

En un aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de CDR de la cadena alfa de un receptor de células T (TCR) que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de CDR de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

En otro aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia del dominio variable (V_α) de la cadena alfa de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia del dominio V_α de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias del dominio V_α de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia del dominio variable (V_β) de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia del dominio V_β de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias del dominio V_β de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

En aún otro aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de la cadena alfa de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC

(pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

En aún otro aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de CDR de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

En otro aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia del dominio variable (V_α) de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias del dominio V_α de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia del dominio variable (V_β) de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias del dominio V_β de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

En aún otro aspecto, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 1; y/o b) una secuencia de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 1, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, 1) la CDR de la cadena alfa de un TCR, el dominio V_α de un TCR y/o una cadena alfa de un TCR están

codificados por un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRAV, TRAJ, y TRAC que se enumeran en la Tabla 1, y/o 2) la CDR de la cadena beta de un TCR, el dominio V_β de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están codificados por un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se enumeran en la Tabla 1, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas, en comparación con la secuencia de CDR de referencia cognada que se enumera en la Tabla 1. En otra forma de realización, un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPET. En aún otra forma de realización, la proteína de unión es quimérica, humanizada o humana. En aún otra forma de realización, la proteína de unión es un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (TCRcs), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector, opcionalmente en donde el dominio de unión comprende un dominio transmembrana y un dominio efector que es intracelular. En otra forma de realización, la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente, opcionalmente en donde la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente por medio de un péptido conector. En aún otra forma de realización, la cadena alfa de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente a una unidad, opcionalmente en donde dicha unidad unida de manera covalente comprende una marca o una etiqueta de afinidad. En aún otra forma de realización, la marca de afinidad se selecciona del grupo que consiste en una marca de enriquecimiento de CD34, la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a calmodulina (CBP), una marca de proteína C, una marca Myc, una marca Halo, una marca HA, una marca Flag, una marca His, una marca de biotina y una marca V5, y/o en donde la etiqueta es una proteína fluorescente. En otra forma de realización, la unidad unida de manera covalente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, una citoquina, una toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aún otra forma de realización, la proteína de unión se une al complejo pMHC sobre una superficie celular. En aún otra forma de realización, un MHC es un multímero de MHC, opcionalmente en donde el multímero de MHC es un tetrámero. En otra forma de realización, el

MHC es una molécula del MHC de clase I. En aún otra forma de realización, el MHC comprende una cadena alfa del MHC que es de un serotipo HLA-A*02 de HLA. En aún otra forma de realización, el alelo de HLA se selecciona del grupo que consiste en los alelos HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 y HLA-A*0207. En otra forma de realización, la unión de una proteína de unión descrita en la presente a un complejo de péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC) genera una respuesta inmunológica, opcionalmente en donde dicha respuesta inmunológica es una respuesta de células T. En aún otra forma de realización, la respuesta de células T se selecciona del grupo que consiste en expansión de células T (por ejemplo, proliferación), liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica. En aún otra forma de realización, la proteína de unión se puede unir de manera específica y/o selectiva a un complejo del péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC) con un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 1×10^{-4} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-5} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-5} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-9} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-9} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-12} M, o menor o igual a aproximadamente 1×10^{-12} M. En aún otra forma de realización, la proteína de unión tiene una afinidad de unión a un péptido-MHC (pMHC) mayor que la de un receptor de células T conocido. En otra forma de realización, la proteína de unión tiene una afinidad de unión por un péptido-MHC (pMHC) que es por lo menos 1,05 veces mayor que la de un receptor de células T conocido. En aún otra forma de realización, la proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido. En aún otra forma de realización, la proteína de unión induce por lo menos un aumento de 1,05 veces en la expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido. Tal como se usa en la presente, la referencia a las veces de cambio que, en algunas formas de realización, puede comprender la comparación con cualquier modalidad de referencia de interés, tal como una comparación con una

proteína de unión diferente; la comparación con la misma proteína de unión en un contexto de expresión semejante diferente de la misma proteína de unión en una célula inmunológica diferente, a un nivel diferente, en combinación con otros agentes que se describen en la presente; y semejantes. En otra forma de realización, la célula diana es de una línea celular CaSki, SCC152 o SCC090. En aún otra forma de realización, la célula diana es una célula cancerosa, 5 opcionalmente en donde dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de cabeza y cuello cell, una célula de cáncer orofaríngeo cell, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer anal, una célula de cáncer de vagina, una célula de cáncer de vulva o una célula de cáncer de pene. En aún otra forma de realización, una proteína de unión que se describe en la presente no se une a un complejo de péptido-MHC (pMHC), en donde el péptido comprende la secuencia de 10 aminoácidos YMLDLQPET. En aún otra forma de realización, una proteína de unión que se describe en la presente no se une a un complejo de péptido-MHC (pMHC), opcionalmente en donde el péptido deriva de SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 o XM_00172256. Estos genes son bien conocidos y son reconocidos en la materia estando anotados con los 15 siguientes números de ID del Gen en NCBI, cada uno de los cuales se encuentra disponible en la Red Informática Mundial en ncbi.nlm.nih.gov/gene: SPTA1: ID del Gen 6708; MPL: ID del Gen 4352; HERC1: ID del Gen 8925; CPAMD8: ID del Gen 27151; INTS4: ID del Gen 92105; y NUTM1: ID del Gen 256646. El XM_00172256: se mapea en la región del centrómero heteroaromático del cromosoma 20 y se ha eliminado de la anotación RefSeq lo cual indica una 20 falta de evidencia de su expresión.

En aún otro aspecto, se provee una cadena alfa y/o una cadena beta de un TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa y de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 1.

En otro aspecto, se provee una molécula de ácido nucleico aislada que se hibridiza, en 25 condiciones severas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 1, o una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 1, opcionalmente en donde la molécula de ácido

nucleico aislada comprende 1) un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC, o un fragmento del mismo, seleccionado del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC que se enumeran en las Tablas 1 y/o 2) un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento del mismo, seleccionado del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se enumeran en la Tabla 1.

5 Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el ácido nucleico es de codones optimizados para la expresión en una célula huésped.

10 En aún otro aspecto, se provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el vector es un vector de clonación, un vector de expresión o un vector viral. En otra forma de realización, un vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , un receptor de TGF β II dominante negativo (DN-TGF β RII), un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En aún otra forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable está ligado operativamente a un

15 ácido nucleico que codifica una marca. En aún otra forma de realización, el ácido nucleico que codifica una marca se encuentra 5' corriente arriba con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable de manera tal que la marca se fusiona con el extremo N-terminal de CD8 α , CD8 β , del DN-TGF β RII y/o del marcador de proteínas seleccionable. En otra forma de realización, la marca es una marca

20 de enriquecimiento de CD34. En aún otra forma de realización, un ácido nucleico aislado que se describe en la presente, ya sea solo (por ejemplo, que codifica TCR α y/o TCR β), o en combinación con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable están interconectados con un sitio de entrada a ribosomas interno o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido autoescindible. En aún otra

25

forma de realización, el péptido autoescindible es P2A, E2A, F2A o T2A.

En aún otro aspecto, se provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente, comprende un vector descrito en la presente y/o expresa una proteína de unión descrita en la presente, opcionalmente en donde la célula está modificada genéticamente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la célula huésped comprende el noqueo de un gen cromosómico de un gen TCR, un gen HLA o ambos. En otra forma de realización, una célula huésped comprende un noqueo de un gen HLA seleccionado entre un gen de macroglobulina $\alpha 1$, un gen de macroglobulina $\alpha 2$, un gen de macroglobulina $\alpha 3$, un gen de microglobulina $\beta 1$, un gen de microglobulina $\beta 2$ y combinaciones de los mismos. En aún otra forma de realización, una célula huésped comprende el noqueo de un gen de un TCR seleccionado entre un gen de la región variable de un TCR α , un gen de la región variable de un TCR β , un gen de una región constante de un TCR y combinaciones de los mismos. En aún otra forma de realización, una célula huésped expresa CD8 α , CD8 β , un DN-TGF β RII y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es DHFR. En otra forma de realización, CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable se fusionan con una marca de enriquecimiento en CD34. En aún otra forma de realización, las células huésped se enriquecen usando una marca de enriquecimiento de CD34. En aún otra forma de realización, una célula huésped es una célula inmunológica. En otra forma de realización, la célula inmunológica es un linfocito citotóxico, una célula precursora de linfocitos citotóxicos, una célula progenitora de linfocitos citotóxicos, una célula madre de linfocitos citotóxicos, una célula T CD4 $^{+}$, una célula T CD8 $^{+}$, una célula T doble negativa CD4/CD8, una célula T gamma delta ($\gamma\delta$), una célula asesina natural (NK), una célula T-NK, una célula dendrítica o una combinación de las mismas. En otra forma de realización, una célula T es una célula T naïve, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o una combinación de las mismas. En aún otra forma de realización, una célula T es una célula T primaria o una célula de una línea de células T. En aún otra forma de realización, una célula T no expresa o presenta

una menor expresión en superficie de un TCR endógeno. En otra forma de realización, una célula huésped puede producir una citoquina o una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende el epitope de un péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC. En aún otra forma de realización, la célula huésped se pone en contacto con una célula diana *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En aún otra forma de realización, la citoquina es TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ . En otra forma de realización, una molécula citotóxica comprende perforinas y/o granzimas, opcionalmente en donde la molécula citotóxica es la granzima B. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede producir un nivel más alto de una citoquina o de una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que expresa un epitope del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede producir un nivel por lo menos 1,05 veces mayor de una citoquina o de una molécula citotóxica. En otra forma de realización, una célula huésped puede matar una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epitope del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC. En aún otra forma de realización, la muerte se determina mediante un ensayo de muerte celular. En aún otra forma de realización, la relación entre una célula huésped y una célula diana en un ensayo de muerte celular es de entre 20:1 y 0,625:1. En otra forma de realización, la célula diana es una célula T2 pulsada con entre 1 μ g/ml y 50 pg/ml del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede matar un mayor número de células diana cuando se pone en contacto con células diana que expresan un epitope del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede matar un número por lo menos 1,05 veces mayor de células diana. En otra forma de realización, la célula diana es de una línea celular CaSki, SCC152 o SCC090. En aún otra forma de realización, un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPET. En aún otra forma de realización, una molécula de MHC es una molécula del MHC de clase I. En otra forma de realización, una molécula de MHC comprende una cadena alfa de un MHC que es de un serotipo HLA-A*02 de HLA. En aún otra forma de realización, el alelo de HLA se selecciona del grupo que consiste en los alelos HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06 y HLA-A*02:07. En aún otra forma de realización, una célula diana es de una línea celular seleccionada del grupo

que consiste en las líneas celulares CaSki, SCC152 y SCC090, es una célula cancerosa que expresa un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ o no es una línea celular siHa y/o no es una línea celular NCI-H1792. En otra forma de realización, la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de cabeza y cuello, una célula de cáncer orofaríngeo, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer anal, una célula de cáncer de vagina, una célula de cáncer de vulva y una célula de cáncer de pene. En aún otra forma de realización, a) una célula huésped no induce expansión de células T, liberación de citoquinas o muerte citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítopo peptídico SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1, y/o XM_00172256 en el contexto de una molécula de MHC y/o b) una célula huésped no expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, no es reconocida por una proteína de unión que se describe en la presente, no es del serotipo HLA-A*02 y/o no expresa un alelo HLA-A*02, tal como HLA-A*02:01 y/o HLA-A*02:06.

En otro aspecto, se provee una población de las células huésped que se describen en la presente.

En aún otro aspecto, se provee una composición que comprende: a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula huésped descrita en la presente y/o e) una población de las células huésped descritas en la presente, y un vehículo.

En aún otro aspecto, se provee un dispositivo o un kit que comprende: a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula huésped descrita en la presente y/o e) una población de las células huésped descritas en la presente, donde dicho dispositivo o kit opcionalmente comprende un reactivo para detectar la unión de a), d) y/o e) a un complejo pMHC.

En otro aspecto, se provee un método para producir una proteína de unión descrita en la presente, en donde dicho método comprende los pasos de: (i) cultivar una célula huésped transformada que ha sido transformada mediante un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de unión

expresada.

En aún otro aspecto, se provee un método para producir una célula huésped que expresa una proteína de unión descrita en la presente, en donde dicho método comprende los pasos de: (i) introducir un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en la célula huésped; (ii) cultivar la célula huésped transformada en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión.

En aún otro aspecto, se provee un método para detectar la presencia o ausencia de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o de una célula que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉, opcionalmente en donde la célula es una célula hiperproliferativa, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en una muestra mediante el uso de por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, o por lo menos una célula huésped descrita en la presente, en donde la detección del antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ es indicativa de la presencia de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o de una célula que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, por lo menos una proteína de unión, o por lo menos una célula huésped, forma un complejo con el péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC, y el complejo se detecta mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular. En otra forma de realización, el método comprende además obtener una muestra de un sujeto. En aún otra forma de realización, el método comprende además confirmar las células que expresan HPV16 E7₁₁₋₁₉ mediante una biopsia de médula ósea.

En otro aspecto, se provee un método para detectar el nivel de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto, que comprende: a) poner una muestra obtenida del sujeto en contacto con por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de las células huésped descritas en la presente; y b) detectar el nivel de reactividad, en donde un mayor nivel de

reactividad en comparación con un nivel control indica el nivel de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el nivel control es un número de referencia. En otra forma de realización, el nivel control es un nivel de un sujeto que no padece el trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

En aún otro aspecto, se provee un método para monitorear el progreso de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto, donde dicho método comprende: a) detectar en una muestra de un sujeto en un primer punto de tiempo el nivel de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ o una célula de interés que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉, como se describe en la presente; b) repetir el paso a) en un punto de tiempo subsiguiente; y c) comparar el nivel del antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ o de la cell de interés que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉ detectado en los pasos a) y b) para monitorear el progreso de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el sujeto, en donde un nivel ausente o reducido del antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ o la célula de interés que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉ detectado en el paso b) en comparación con el paso a) indica una inhibición del progreso del trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el sujeto.

Se proveen además numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o que se pueden combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el sujeto ha recibido un tratamiento para tratar el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ entre el primer punto de tiempo y el punto de tiempo subsiguiente.

En aún otro aspecto, se provee un método para evaluar la eficacia de una terapia para un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ que comprende: a) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida de un sujeto y por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de las células huésped que se describen en la presente, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proveer por lo menos una parte de la terapia para el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ al sujeto, y b) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de las células huésped que se describen en la presente, en una segunda muestra obtenida del sujeto después de proveer la parte de la terapia para el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, en donde un nivel ausente o reducido de reactividad en la segunda muestra, con relación a la primera muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para tratar el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el nivel de reactividad está indicado por a) la presencia de unión y/o b) la activación y/o la función efectora de células T. En otra forma de realización, la función efectora o activación de células T es una proliferación de células T, muerte citotóxica o liberación de citoquinas por células T. En aún otra forma de realización, la unión, activación y/o función efectora de células T se detecta usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción unida a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular.

En otro aspecto, se provee un método para prevenir y/o tratar un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células que expresan por lo
5 menos una proteína de unión descrita en la presente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, una célula es una célula alogénica, una célula singénica o una célula autóloga. En otra forma de realización, la
10 célula está modificada genéticamente. En aún otra forma de realización, la célula comprende el noqueo de un gen cromosómico de un gen TCR, un gen HLA o de ambos un gen TCR y un gen HLA. En aún otra forma de realización, una célula comprende un noqueo de un gen HLA seleccionado entre un gen de macroglobulina $\alpha 1$, un gen de macroglobulina $\alpha 2$, un gen de macroglobulina $\alpha 3$, un gen de microglobulina $\beta 1$, un gen de microglobulina $\beta 2$ y una combinación
15 de los mismos. En otra forma de realización, una célula comprende el noqueo de un gen TCR seleccionado entre un gen de la región variable α de un TCR, un gen de la región variable β de un TCR, un gen de una región constante TCR y combinaciones de los mismos. En aún otra forma de realización, una expresa CD8 α , CD8 β , un DN-TGF β RII, y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es DHFR, y
20 además, opcionalmente, en donde el CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable está fusionado con una marca de enriquecimiento en CD34. En aún otra forma de realización, las células se enriquecen usando la marca de enriquecimiento de CD34. En otra forma de realización, la célula es una célula inmunológica. En aún otra forma de realización, la célula inmunológica es un linfocito citotóxico, una célula precursora de linfocitos citotóxicos, una
25 célula progenitora de linfocitos citotóxicos, una célula madre de linfocitos citotóxicos, una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T doble negativa CD4/CD8, una célula T gamma delta ($\gamma\delta$), una célula asesina natural (NK), una célula T-NK, una célula dendrítica o una combinación de las mismas. En aún otra forma de realización, una célula T es una célula T naive, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o una combinación de las mismas. En otra

forma de realización, una célula T es una célula T primaria o una célula de una línea de células T. En aún otra forma de realización, una célula T no expresa o presenta una menor expresión en superficie de un TCR endógeno. En aún otra forma de realización, una célula puede producir una citoquina o una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende el epítipo de un péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC. En otra forma de realización, la citoquina es TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ . En aún otra forma de realización, una molécula citotóxica comprende perforinas y/o granzimas, opcionalmente en donde la molécula citotóxica es la granzima B. En aún otra forma de realización, una célula puede producir un nivel más alto de una citoquina o de una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que expresa un epítipo del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉. En aún otra forma de realización, una célula puede producir un nivel por lo menos 1,05 veces mayor de una citoquina o de una molécula citotóxica. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede matar una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítipo del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede matar un mayor número de células diana cuando se pone en contacto con células diana que expresan un epítipo del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉. En otra forma de realización, una célula huésped puede matar un número por lo menos 1,05 veces mayor de células diana. En aún otra forma de realización, un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPET. En aún otra forma de realización, una molécula de MHC es una molécula del MHC de clase I. En otra forma de realización, una molécula de MHC comprende una cadena alfa de un MHC que es de un serotipo HLA-A*02 de HLA. En aún otra forma de realización, el alelo de HLA se selecciona del grupo que consiste en los alelos HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06 y HLA-A*02:07. En aún otra forma de realización, una célula diana es una célula no maligna o una célula hiperproliferativa que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto. En otra forma de realización, una composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En aún otra forma de realización, una composición induce una respuesta inmunológica contra células no malignas o células hiperproliferativas que expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto. En aún otra forma de realización, una composición induce una respuesta

inmunológica de células T específica del antígeno contra células no malignas o células hiperproliferativas que expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto. En otra forma de realización, una respuesta inmunológica de células T específica del antígeno comprende por lo menos una entre una respuesta de linfocitos T CD4⁺ auxiliares (Th) y una respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxica (CTL). En aún otra forma de realización, el trastorno está asociado con una infección por HPV, tal como una infección por HPV16. En otra forma de realización, el cancer es cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), un cáncer orofaríngeo, un cáncer de cuello uterino, un cáncer anal, un cáncer de vagina, un cáncer de vulva y/o un cáncer de pene. En aún otra forma de realización, un sujeto está recibiendo o ha recibido previamente un trasplante de células hematopoyéticas (HCT), opcionalmente en donde el HCT comprende células que no expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, que no son reconocidas por una proteína de unión descrita en la presente, no son del serotipo HLA-A*02 y/o no expresan un alelo HLA-A*02:01. En otra forma de realización, el HCT comprende una célula hematopoyética donante que comprende el noqueo cromosómico de un gen que codifica un componente del HLA, el noqueo cromosómico de un gen que codifica un componente de un TCR o ambos. En aún otra forma de realización, el sujeto ha recibido previamente una quimioterapia de linfodepleción. En otra forma de realización, la quimioterapia de linfodepleción comprendía ciclofosfamida, fludarabina, anti-globulina de timocitos o una combinación de las mismas. En aún otra forma de realización, el método comprende además administrar por lo menos un tratamiento adicional para el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo a un sujeto. En aún otra forma de realización, por lo menos un tratamiento adicional para el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo se administra de manera concurrente o sucesiva con la composición. En otra forma de realización, el sujeto es un modelo de animales de un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o el sujeto es un mamífero, opcionalmente en donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor.

En aún otro aspecto, se provee un vector de expresión que comprende un promotor ligado operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , un DN-TGF β RII, y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas

seleccionable es DHFR.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable está ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una marca de manera tal que la marca estará fusionada con CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable. En otra forma de realización, un ácido nucleico que codifica una marca se encuentra 5' corriente arriba con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable de manera tal que la marca se fusiona con el extremo N terminal de CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteínas seleccionable. En aún otra forma de realización, la marca es una marca de enriquecimiento de CD34. En aún otra forma de realización, el vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un TCR α y/o TCR β . En otra forma de realización, el TCR α , TCR β y/o DN-TGF β RII comprende un dominio transmembrana mutado y/o un dominio constante mutado. En aún otra forma de realización, el dominio transmembrana mutado y/o el dominio constante mutado aumenta la expresión sobre la superficie celular de TCR α , TCR β y/o DN-TGF β RII, en tanto disminuye la expresión de un TCR α , TCR β y/o TGF β RII endógeno. En aún otra forma de realización, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII, el marcador de proteínas seleccionable, TCR α y/o el TCR β , están interconectados con un sitio de entrada a ribosomas interno o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido autoescindible. En otra forma de realización, el péptido autoescindible es P2A, E2A, F2A o T2A. En aún otra forma de realización, el vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 1, o una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 1, opcionalmente en donde dicha molécula de ácido nucleico aislada comprende 1) un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC, o un fragmento del mismo, seleccionado del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC que se enumeran

en las Tablas 1 y/o 2) un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC, o un fragmento del mismo, seleccionado del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se enumeran en la Tabla 1. En aún otra forma de realización, un vector tiene o comprende una secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la Tabla 3, o un fragmento de la misma, opcionalmente en donde el fragmento codifica DN-TGFβRII.

5 **Breve Descripción de las Figuras**

A no ser que más adelante se describa de otra manera, para generar los datos que se muestran en las figuras y se ejemplifican en los ejemplos se usaron versiones del TCR modificadas con MGTM (por ejemplo, E7-11-28 MGTM).

En la Figura 1 se muestra una secuencia peptídica HPV16 E7₁₁₋₁₉.

10 En la Figura 2 se muestra la selección de una variedad de TCR que reconoce a HPV16 E7₁₁₋₁₉. Utilizando una plataforma propia ReceptorScan se identificaron cuatrocientos cincuenta y nueve (459) TCR específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET). En resumen, el día -4 se aislaron monocitos CD14+ de PBMC de donantes sanos HLA-A*02:01 y se diferenciaron a DC maduras. El día -1, se aislaron células T CD8 naïve de PBMC autólogas y se dejaron reposar durante toda la
15 noche. El cocultivo de células CD8 T y DC naïve se realizó después de 3 h de pulsar las DC con 1 µg/ml de péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ como parte de los cribados multiplexados de ReceptorScan, seguido de una fase de expansión celular de 11 días. La tinción con dextrámero se realizó con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ específico de HLA-A*02:01 (YMLDLQPET) para identificar los clones. Se utilizaron dextrámeros con código de barras de ADN para aislar células específicas de
20 HPV16 E7₁₁₋₁₉. Los pares de TCR alfa beta se identificaron utilizando la plataforma 10X de Genomics.

Se transdujeron células pan-T para que expresasen individualmente TCR específicos de HPV 293. Se evaluó la expresión en superficie de los TCR mediante tinción con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉. Las células T modificadas se cocultivaron con células diana marcadas con
25 Incucyte® NuLight Red, por ejemplo células T2 cargadas con 1 ng/ml de péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ y células CaSki. La supervivencia de las células diana se cuantificó mediante adquisición de imágenes en función del tiempo como una lectura de la citotoxicidad de las células T. Las células no transducidas (NTD) sirvieron como control. Se seleccionaron cincuenta y nueve (59) de los 293 TCR que se mencionan en la Figura 2 para una evaluación adicional de la expresión en superficie

y el potencial citotóxico contra líneas celulares positivas y negativas para HPV16 y HLA-A*02:01.

En las Figuras 3A-3D se muestran los resultados de la selección del TCR de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en base a la expresión y la función citotóxica. Se transdujeron células pan-T de un donante sano positivo para HLA-A*02:01 para expresar 59 TCR de HPV16 E7₁₁₋₁₉ que se seleccionaron entre el cribado de VAYG descrito en la Figura 2 anterior. Veinticuatro (24) de los 59 TCR se seleccionaron en base a la alta unión a la superficie del dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) y se evaluaron adicionalmente en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en el que se compararon con el "TCR de comparación". En la Figura 3A se muestran diagramas de puntos de la expresión en superficie de los 24 TCR evaluados mediante tinción con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) específico de A*02:01. Se muestran las respuestas citotóxicas de estos TCR a las líneas celulares diana HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺, CaSki (Figura 3B), SCC152 (Figura 3C) y SCC090 (Figura 3D). Las células T modificadas se cocultivaron con líneas de células diana marcadas con Incucyte®NucLight Red en las proporciones de célula efectora a célula diana (E:T) que se indican, y se cuantificó su supervivencia en un instrumento IncuCyte® como una lectura de la citotoxicidad de las células T.

En las Figuras 4A-4K se muestran los resultados de la evaluación funcional de los TCR de HPV16 E7₁₁₋₁₉. Las células pan-T aisladas de tres PBMC de donantes sanos positivos para HLA-A*02:01 se transdujeron para que expresasen TCR específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉, E7-11-194, E7-11-176 y E7-11-28, y el 'TCR de comparación' y se evaluaron las respuestas funcionales a células diana positivas y negativas para HPV16 y HLA-A*02:01. En la Figura 4A se muestran los resultados del gráfico de puntos, que muestran la expresión de los TCR específicos de E7₁₁₋₁₉ evaluados mediante la tinción con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ específico de A*02:01, (YMLDLQPET). Se muestran las respuestas funcionales de los TCR específicos de E7₁₁₋₁₉ a líneas de células diana HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺, CaSki (Figura 4B y Figura 4C), SCC152 (Figura 4D y Figura 4E), SCC090 (Figura 4F y Figura 4G), la línea celular de control negativo HLA-A*02:01⁻ HPV16⁺ SiHa (Figura 4H y Figura 4I), y la línea celular HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻, NCI-H1792 (Figura 4J y Figura 4K). Las células T modificadas se cocultivaron con líneas de células diana marcadas con Incucyte® NucLight Red en las proporciones E:T que se indican, y su supervivencia se cuantificó con un instrumento IncuCyte® como lecturas de citotoxicidad de las células T. Se

analizó y se muestra la producción de IFN- γ , IL-2, TNF- α y granzima B en sobrenadantes de cocultivo a las 24 h (E:T 1:1). Se usó una condición de "solo células T" para determinar el nivel de fondo de la producción de citoquinas. Las líneas punteadas representan los niveles más altos de citoquinas en condiciones de "solo células T" (es decir, los niveles de fondo de producción o proliferación de citoquinas por parte de las células T). Para los ensayos de citotoxicidad, se compararon las medias usando ANOVA de una sola vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, donde los TCR se compararon con el 'TCR de comparación'. Para las líneas celulares CaSki, SCC152 y SCC090, solo se muestran diferencias que no fueron significativas. El resto de las diferencias son significativas con $P < 0,05$. Ninguna de las diferencias es significativa para las líneas celulares SiHa y NCI-H1792.

En la Figura 5 se muestra que TCR E7-11-28 no muestra alorreactividad para 108 de 110 tipos de HLA. Se cocultivaron durante 48 h células pan-T que expresaban el TCR de E7-11-28 o células T de control no transducidas con células nulas para MHC HEK293T que reexpresan uno de los 110 MHC de Clase I más frecuentes en la población de los EE.UU. En el cribado se incluyó un control positivo que consistía en células HEK293T que expresaban tanto un fragmento de HPV16-E7 que contenía el epítipo E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) como HLA-A*02:01. Después de 48 h de cocultivo se midió la inhibición del crecimiento de las células diana por parte de las células pan-T que expresan TCR E7-11-28 con relación a las células T de control no transducidas como una lectura de la reactividad de las células TCR E7-11-28 a moléculas del MHC alogénicas. Se indican el control positivo y los alelos alorreactivos (inhibición de células diana > 20%).

En las Figuras 6A y 6B se muestra una selección adicional de una variedad de TCR que reconocen HPV16 E7₁₁₋₁₉. Se transdujeron células pan-T aisladas de PBMC de un donante sano positivo para HLA-A*02:01 para que expresasen 161 TCR específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ individualmente y el 'TCR de comparación'. En la Figura 6A se muestran datos representativos de la expresión en superficie de los TCR evaluados mediante tinción con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y respuestas citotóxicas a células T2 pulsadas con 200 pg/ml de péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ y línea celular diana SCC152 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺. En la Figura 6B se muestra que se seleccionaron 15 de 161 TCR para una evaluación adicional de la expresión en superficie y el potencial citotóxico contra HPV16 y líneas celulares positivas y negativas para HLA-A*02:01.

En la Figura 7 se muestran los resultados de la selección del TCR de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en base a la expresión y la función citotóxica. Las células pan-T aisladas de PBMC de un donante sano positivo para HLA-A*02:01 se transdujeron para que expresasen los TCR E7-11-28 y E7-11-455 específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y el 'TCR de comparación' y se evaluaron las respuestas citotóxicas a células diana positivas y negativas para HPV16 y HLA-A*02:01. Se muestran las respuestas funcionales de los TCR específicos de E7₁₁₋₁₉ a las líneas celulares diana HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ CaSki, SCC152, SCC090, la línea celular de control negativo HLA-A*02:01⁻ HPV16⁺ SiHa y la línea celular HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻, NCI-H1792. Las células T modificadas se cocultivaron con líneas de células diana marcadas con IncuCyte® NucLight™ Red en las proporciones E:T que se indican, y se cuantificó su supervivencia en un instrumento IncuCyte® como una lectura de la citotoxicidad de las células T. Para los ensayos de citotoxicidad, se compararon las medias mediante ANOVA de una sola vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett en la que se compararon los TCR con el 'TCR de comparación'. * indica p< 0,05.

En la Figura 8 se da un resumen de resultados donde se ve que TCR-28 muestra una citotoxicidad comparable y una función efectora superior con relación al TCR de comparación.

En las Figuras 9A-9E se muestran las respuestas de proliferación de células T producidas por los TCR de HPV16 E7₁₁₋₁₉. Se transdujeron las células pan-T aisladas de tres PBMC de donantes sanos positivos para HLA-A*02:01 para que expresasen los TCR E7-11-194, E7-11-176 y E7-11-28 específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y el 'TCR de comparación' y se evaluaron las respuestas funcionales a células diana positivas y negativas para HPV16 y HLA-A*02:01. Para determinar la proliferación de células T que expresan TCR específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉, se marcaron las células T modificadas con un colorante de proliferación y se cocultivaron con líneas celulares diana (CaSki, Figura 9A; SCC152, Figura 9B; SCC090, Figura 9C, SiHa, Figura 9D; y NCI-H1792, Figura 9E durante 96 h (E:T 1:1). Estas líneas celulares tienen las siguientes propiedades: CaSki, SCC152 y SCC090 son HLA-A*02:01⁺HPV16⁺; SiHa es HLA-A*02:01⁻HPV16⁺ y NCI-H1792 es HLA-A*02:01⁺HPV16⁻. Para evaluar la proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ se utilizó dilución de colorante. Antes del análisis mediante citometría de flujo se agregaron esferas de recuento a las muestras y se mencionaron los números absolutos de células T CD8⁺ y CD4⁺ divididas. Se

usó una condición de "solo células T" para determinar el nivel de fondo de proliferación. La línea punteada representa los niveles más altos de proliferación en la condición de "solo células T". Las medias se compararon usando ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett donde los TCR se compararon con el 'TCR de comparación'. Para CsSki (Figura 9A), SCC152 (Figura 9B) y SCC090 (Figura 9C), solo se muestran las diferencias que no fueron significativas (ns). El resto de las diferencias son significativas con $P < 0,05$.

En las Figuras 10A y 10B se muestran los resultados de un análisis *SafetyScan* de todo el genoma para identificar elementos inespecíficos putativos para TCR E7-11-28. En la Figura 10A se provee una descripción general de un cribado *SafetyScan* representativo, no limitativo y de todo el genoma. En la Figura 10B se muestran los datos del cribado *SafetyScan* de TCR E7-11-28 que identifican siete potenciales elementos inespecíficos en un cribado de > 600.000 fragmentos de proteínas que abarcan cada proteína humana de tipo salvaje (w.t.). El cribado está diseñado para predecir en exceso los elementos inespecíficos mediante la sobreexpresión de fragmentos de proteínas de 90 aa, que se procesan de manera más eficiente que las proteínas de longitud completa. Los elementos inespecíficos putativos se identifican mediante nombres de genes. XM_0017722256 se mapea a la región del centrómero heterocromático del cromosoma 20 y se eliminó de la anotación RefSeq, lo que indica una falta de evidencia de su expresión. En el análisis de ARN-seq de 51 muestras, incluyendo a muestras de tejido normal, líneas de células cancerosas y muestras de tumores, no se detectó la expresión de este gen.

En las Figuras 11A-11J se muestra que TCR E7-11-28 no presenta reactividad a las líneas de células cancerosas que expresan elementos inespecíficos putativos. Se analizaron las células pan-T que expresan TCR E7-11-28 o las células NTD para determinar su reactividad con las líneas celulares de cáncer HLA-A*02:01⁺ que expresan de manera natural los objetivos identificados en el cribado de seguridad del genoma completo. En las Figuras 11A, 11C, 11E, 11G y 11I se muestran los resultados de las células diana que fueron pulsadas con el péptido E7₁₁₋₁₉ o no pulsadas y cocultivadas con células TCR E7-11-28 o NTD. Se usó la secreción de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo como una lectura de la reactividad del TCR E7-11-28 a las células diana. Como control positivo se usaron células T2 pulsadas con péptidos. Donde se indica se usaron células HLA-A*02:01⁺HPV16⁺ SCC152 como control positivo adicional. Para las líneas celulares

que expresan múltiples elementos inespecíficos, los cocultivos se realizaron solo una vez, pero se muestran en varias figuras. En las Figuras 11B, 11D, 11F, 11H y 11J se muestra la expresión de HERC1, INTS4, CPAMD8, MPL y SPTA1, respectivamente, determinada en las células diana con relación a un gen de control, TBP.

5 En las Figuras 12A-12I se muestra que TCR E7-11-28 no presenta reactividad con células primarias humanas sanas. Se analizaron células pan-T o NTD que expresan TCR E7-11-28 para determinar su reactividad frente a un panel de células primarias o células derivadas de iPS de donantes humanos sanos HLA-A*02:01⁺, incluyendo a las células que expresan de manera natural los elementos inespecíficos putativos identificados en el cribado de seguridad de todo el genoma.

10 En las Figuras 12A a 12O se muestran los resultados de las células diana que fueron pulsadas con el péptido E7₁₁₋₁₉ o no pulsadas, y se cocultivaron con células TCR E7-11-28 o NTD. Se usó la secreción de IFN γ en sobrenadantes de cultivo como una lectura de la reactividad del TCR E7-11-28 a las células diana. Como control positivo se usaron células SCC152 HLA-A*02:01⁺HPV16⁺ y como controles negativos se usaron células NCI-H1792 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻ o T2 sin pulsar u

15 OVCAR-3. En la Figura 12P y la Figura 12Q se muestra la expresión de HERC1 e INTS4, respectivamente, determinada en las células diana con relación a un gen de control, TBP. RT = transcriptasa reversa.

En las Figuras 13A-13D se muestra que TCR E7-11-28 controla eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*. A unos ratones NCG se les inyectaron por vía subcutánea 1x10⁶ células CaSki o

20 1x10⁶ células SCC152 por ratón (n= 8 ratones por grupo). Cuando los tumores alcanzaron 95 $\pm$ 15 mm³ el día 10, se aleatorizaron los ratones y el día 11 se trataron con 20x10⁶ células con TCR E7-11-28, NTD o vehículo. En la Figura 13A y la Figura 13C se muestran los resultados del tratamiento con 20x10⁶ células con TCR E7-11-28, donde se ve una fuerte inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. En la Figura 13B y la Figura 13D se muestran los resultados del

25 crecimiento del tumor de ratón individual por grupo en el transcurso del tiempo. *p< 0,05, ANOVA de una sola vía, corrección de Holms-Šidák para la prueba de comparaciones múltiples *in vivo*. Las etiquetas de línea de datos se muestran en las Figuras 13A y 13C.

En la Figura 14 se muestra que el receptor II de TGF β dominante negativo (DN-TGF β RII) provee a las células que expresan DN-TGF β RII resistencia al efecto supresor de la señalización

de TGF β (por ejemplo, DN-TGF β RII hace que el TCR E7-11-28 sea resistente a la supresión mediada por TGF β). Se cotransdujeron las células T con lentivirus que codificaban TCR E7-11-28 y DN-TGF β RII, respectivamente, y se clasificaron mediante FACS en fracciones positivas para DN-TGF β RII y negativas para DN-TGF β RII. Se cuantificó el IFN γ intracelular dentro de las células T que expresaban el TCR después de 24 horas de cocultivo con células T2 pulsadas con péptido +/- 5 ng/ml de TGF β .

En las Figuras 15A-15C se muestran los resultados de la expresión y evaluación funcional del TCR E7-11-28 y DN-TGF β RII en vectores representativos pNVVD154 y pNVVD160. Se transfectaron PBMC de un donante sano positivo para HLA-A*02:01 para que expresasen HPV16 TCR E7-11-28 utilizando los vectores pNVVD154 y pNVVD160. Como control se usaron PBMC no transfectadas (UTF) del mismo donante. En la Figura 15A se muestran diagramas de puntos de la expresión en superficie de TGF β RII, CD34 y TCR E7-11-28 evaluada mediante tinción con dextrámero de HPV16 E7₁₁₋₁₉ específico de A*02:01 (YMLDLQPET). En la Figura 15B se muestran las respuestas citotóxicas de las células T modificadas con TCR E7-11-28 a las líneas de células diana HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ CaSki y SCC152, y la línea de células diana HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻, NCI-H1792. En el panel superior de la Figura 15A se muestran los resultados de las células T modificadas cocultivadas con las líneas de células diana CaSki y NCI-H1792 (relación E:T de 10:1) y SCC-152 (relación E:T de 5:1) marcadas con IncuCyte® NucLight™ Red, y su supervivencia se cuantificó con IncuCyte® como una lectura de la citotoxicidad de las células T. En el panel inferior de la Figura 15B se muestra la supervivencia de las células diana a las 96 horas para las líneas celulares CaSki, SCC-152 y NCI-H1792. En la Figura 15C se muestran los resultados de los ensayos que prueban la avidéz de las células T. Por ejemplo, se cocultivaron unas células T que expresaban HPV16 TCR E7-11-28 con células T2 que expresaban E7₁₁₋₁₉ pulsadas con péptido (0-1000 pg/ml de péptido E7) IncuCyte® NucLight™ en una relación E:T de 5:1. El gráfico muestra el área bajo la curva (AUC) del crecimiento de células T2 entre 0 y 96 horas de cocultivo. Los experimentos se realizaron por duplicado. Se realizó una prueba t de Mann-Whitney.

A no ser que se indique otra cosa, para cualquier figura que muestre un histograma de barras, una curva, u otros datos asociados con una referencia, las barras, la curva u otros datos

presentados de izquierda a derecha para cada indicación corresponden directamente y en orden a los cuadros de arriba a abajo o de izquierda a derecha, de la referencia.

Descripción Detallada de la Invención

5 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de proteínas de unión, incluyendo a los receptores de células T (TCR), que reconocen el antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ (por ejemplo, un péptido inmunogénico que comprende la secuencia de aminoácidos, YMLDLQPET).

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere, en parte, a las proteínas de unión identificadas (por ejemplo, TCR), células huésped que expresan las proteínas de unión (por ejemplo, TCR), composiciones que comprenden las proteínas de unión (por ejemplo, TCR) y células huésped que expresan las proteínas de unión (por ejemplo, TCR), métodos para diagnosticar, pronosticar y controlar la respuesta de las células T a las células que expresan el antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, y métodos para prevenir y/o tratar un trastorno no maligno, un trastorno 15 hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión del antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ mediante la administración de células huésped que expresan proteínas de unión (por ejemplo, TCR).

I. Definiciones

20 Para mayor conveniencia, aquí se reúnen algunos términos empleados en la Descripción, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

25 El término "administrar" se refiere a proveer un agente farmacéutico o una composición a un sujeto, e incluye, pero de manera no taxativa, a la administración por un profesional médico y a la autoadministración. Esto incluye la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, utilizando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de administración conocidos por los especialistas en la materia. En algunas formas de realización, las

vías de administración para las proteínas de unión que se describen en la presente incluyen vías de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", según se usa en la presente, se refiere a los modos de administración
 5 distintos a la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, sin limitación: inyección e infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. Como alternativa, una proteína de unión según se
 10 describe en la presente se puede administrar por vía no parenteral, por ejemplo por una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede llevar a cabo, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o sobre uno o más períodos prolongados.

Tal como se lo usa en la presente, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia
 15 inmunogénica natural o sintética, tal como una proteína, péptido o hapteno. Un antígeno puede ser un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, o un fragmento del mismo, contra el que se desean respuestas inmunitarias protectoras o terapéuticas.

El término "adyuvante", según se usa en la presente se refiere a sustancias, que cuando se administran antes, de manera conjunta o después de la administración de un antígeno
 20 aceleran, prolongan y/o mejoran la calidad y/o la fuerza de una respuesta inmunológica al antígeno en comparación con la administración del antígeno solo. Los adyuvantes pueden aumentar la magnitud y la duración de la respuesta inmunológica inducida por la vacunación.

El término "anticuerpo", tal como se usa aquí, incluye a los anticuerpos completos y a cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "partes de unión al antígeno") o cadenas
 25 simples de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere, en una forma de realización, a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (cuya abreviatura en la presente es V_H) y una región constante de la cadena pesada. En algunos anticuerpos de origen

natural, la región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En algunos anticuerpos de origen natural, cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (que aquí se abrevia como V_L) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), interdispersas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas, desde el extremo amino terminal hacia el extremo carboxilo terminal, en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" incluye a las células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, y oligodendrocitos).

El término "parte de unión al antígeno" de una proteína de unión, por ejemplo un TCR, como se usa en la presente, se refiere a una o más partes de un TCR que retienen la capacidad de unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un antígeno (por ejemplo, a un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ y MHC/HLA cognato. Dichas partes tienen, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, apropiadamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, apropiadamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 300, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 200 aminoácidos, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un TCR se puede realizar mediante fragmentos de un TCR de longitud completa. Algunos ejemplos de partes de unión abarcadas por el término "parte de unión al antígeno" de un TCR, incluyen (i) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_α y V_β de un TCR, (ii) una región determinante de

complementariedad (CDR) aislada o (iii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un conector sintético. Además, aunque V_α y V_β , están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite crearlas como una única cadena de proteína en la cual las regiones V_α y V_β están apareadas para formar moléculas monovalentes (conocidas como TCR monocatenario (scTCR)). Es la intención que también dichos TCR monocatenarios estén incluidos dentro del término "parte de unión al antígeno" de un TCR. Estos fragmentos de TCR se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en la materia, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que las proteínas de unión completas. Las partes de unión al antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Los términos "región determinante de complementariedad" y "CDR" son sinónimos de "región hipervariable" o "HVR" y en la técnica se sabe que se refieren a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de ciertas proteínas de unión, tales como regiones variables de TCR, que confieren especificidad de antígeno y/o afinidad de unión. Para los TCR, en general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena α (α CDR1, α CDR2 y α CDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena β (β CDR1, β CDR2 y β CDR3). Se cree que la CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado. CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC.

El término "fluido corporal" se refiere a los fluidos que son excretados o secretados del cuerpo así como fluidos que habitualmente no son excretados o secretados del cuerpo (por ejemplo, fluido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, fluido cerebroespinal, cerumen y cera del oído, fluido de Cowper o fluido preeyaculatorio, quilo, quimo, heces, eyaculación femenina, fluido intersticial, fluido intracelular, linfa, menstruación, leche de mama, moco, fluido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, fluido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómitos). En algunas formas de realización, el fluido corporal comprende células inmunológicas, donde opcionalmente las células inmunológicas son linfocitos citotóxicos tales como células T citotóxicas y/o células NK, células T CD4+, y semejantes.

El término "región codificante" se refiere a las regiones de una secuencia nucleotídica que

comprende codones que son traducidos a residuos de aminoácido, mientras que el término “región no codificante” se refiere a las regiones de una secuencia nucleotídica que no son traducidas a aminoácidos (por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3').

El término “complementario” se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos hebras de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma hebra del ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico tiene la capacidad de formar enlaces de hidrógeno específicos (“apareamiento de bases”) con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela con la primera región si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera hebra de ácido nucleico tiene la capacidad de apareamiento de bases con un residuo de una segunda hebra de ácido nucleico que es antiparalela con la primera hebra si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria con una segunda región del mismo ácido nucleico o uno diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de un modo antiparalelo, por lo menos un residuo nucleotídico de la primera región tiene la capacidad de apareamiento de bases con un residuo de la segunda región. En algunas formas de realización En algunas formas de realización, la primera región comprende una primera parte y la segunda región comprende una segunda parte, por lo que, cuando la primera y la segunda partes están dispuestas de manera antiparalela, por lo menos aproximadamente el 50% y, en otras formas de realización, por lo menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o cualquier rango intermedio, inclusive, tal como por lo menos aproximadamente el 80% - 100%, de los residuos de nucleótidos de la primera parte tienen la capacidad de apareamiento de bases con residuos de nucleótidos en la segunda parte. En algunas formas de realización, todos los residuos de nucleótidos de la primera parte tienen la capacidad de apareamiento con los residuos de nucleótidos de la segunda parte.

Tal como se lo usa en la presente, el término “coestimula” con referencia a las células inmunológicas activadas incluye la capacidad de una molécula coestimuladora para proveer una segunda señal, mediada por receptor no activador (una “señal coestimuladora”) que induce la proliferación o función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede resultar en una

secreción de citoquinas, por ejemplo, en una célula T que ha recibido una señal mediada por receptor de células T. Las células inmunológicas que han recibido una señal mediada por un receptor celular, por ejemplo, mediante un receptor activador, se denominan "células inmunológicas activadas" en la presente.

5 "CD3" se conoce en el arte como un complejo de múltiples proteínas de seis cadenas (véase Abbas y Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology* (9ª Edición) (2018); Janeway y col. (*Immunobiology*) (9ª Edición) (2016)). En los mamíferos, el complejo comprende una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ y un homodímero de cadenas CD3 ζ . Las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de la superficie celular relacionadas, de la superfamilia de las
10 inmunoglobulinas, que contienen un solo dominio inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ están cargadas negativamente, lo cual es una característica que se cree que permite que estas cadenas se asocien con regiones cargadas positivamente o residuos de cadenas receptoras de células T. Las colas intracelulares de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen cada una un único motivo conservado conocido como motivo de activación
15 inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM, mientras que cada cadena CD3 ζ tiene tres ITAM. Sin deseos de ser limitados por una la teoría, se cree que los ITAM son importantes para la capacidad de señalización de un complejo TCR. El CD3 que se utiliza de acuerdo con la presente invención puede ser de diversas especies animales, que incluyen seres humanos, ratones, ratas u otros mamíferos.

20 Un "componente de un complejo TCR", como se usa en la presente, se refiere a una cadena TCR (es decir, TCR α , TCR β , TCR γ o TCR δ), una cadena CD3 (es decir, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ o CD3 ζ), o un complejo formado por dos o más cadenas de TCR o cadenas de CD3 (por ejemplo, un complejo de TCR α y TCR β , un complejo de TCR γ y TCR δ , un complejo de CD3 ϵ y CD3 δ , un complejo de CD3 γ y CD3 ϵ , o un complejo sub-TCR de TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ , y dos
25 cadenas CD3 ϵ).

"Receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a una proteína de fusión que se modifica para que contenga dos o más secuencias de aminoácidos unidas entre sí de una manera que no ocurre naturalmente o no ocurre de manera natural en una célula huésped, donde dicha proteína de fusión puede funcionar como receptor cuando está presente en la superficie de una

célula. Los CAR que abarca la presente invención incluyen una parte extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno (es decir, obtenido o derivado de una inmunoglobulina o molécula similar a inmunoglobulina, por ejemplo un TCR específico para un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, una proteína de unión derivada de TCR de cadena sencilla, un scFv derivado de un anticuerpo, un dominio de unión al antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor asesino de una célula NK, y otros similares) unido a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (por ejemplo un dominio efector, que opcionalmente contiene dominio(s) coestimulante(s)) (véase por ejemplo, Sadelain y col. (2013) *Cancer Discov.* 3: 388; véase también Harris y Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 220; Stone y col. (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 1163).

Tal como se la usa en la presente, la expresión "respuesta de células T citotóxicas (CTL)" se refiere a una respuesta inmunológica inducida por células T citotóxicas. Las respuestas de las CTL están mediadas principalmente por células T CD8⁺.

El término "que consiste esencialmente en" no es equivalente a "que comprende" y se refiere a los materiales o pasos que se especifican en un reivindicación, o a aquellos que no afectan materialmente las características básicas de un objeto que se reivindica. Por ejemplo, un dominio, región o módulo de proteína (por ejemplo, un dominio de unión, región bisagra, módulo conector) o una proteína (que puede tener uno o más dominios, regiones o módulos) "consiste esencialmente en" una secuencia de aminoácidos en particular cuando la secuencia de aminoácido un dominio, región, módulo o proteína incluye extensiones, supresiones, mutaciones o una combinación de las mismas (por ejemplo, aminoácidos en el extremo amino o carboxi o entre dominios) que, en combinación, contribuyen como máximo en un 20% (por ejemplo, como máximo en un 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%) de la longitud de un dominio, región, módulo o proteína y no afectan sustancialmente (es decir, no reducen la actividad en más del 50%, por ejemplo en no más del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1%) la actividad de los uno o más dominios, regiones, módulos o proteínas (por ejemplo, la afinidad de unión a la diana de una proteína de unión).

La expresión "determinar un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto" se considera que se refiere a la determinación de un régimen de tratamiento (es decir, una terapia individual o

una combinación de diferentes terapias que se usan para la prevención y/o tratamiento de la infección viral en el sujeto) para un sujeto que se comienza, modifica y/o termina en base o esencialmente en base o por lo menos parcialmente en base a los resultados del análisis de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo es comenzar una terapia con adyuvante después de la cirugía cuyo propósito es disminuir el riesgo de recurrencia, otro podría ser modificar la dosificación de una quimioterapia particular. La determinación se puede basar, además de los resultados de acuerdo al análisis de acuerdo con la presente invención, en las características personales del sujeto a tratar. En la mayoría de los casos, la determinación actual del régimen de tratamiento adecuado para el sujeto se realizará en base al médico o doctor que lo atiende.

El término “receptor de TGF β dominante negativo” o “DN-TGF β R” se refiere a una variante o mutante del receptor beta del factor de crecimiento transformante (TGF) que provee resistencia a la señalización de TGF β .

Hay cinco receptores tipo II (receptores de activación) y siete receptores tipo I (receptores de propagación de la señalización). El receptor de TGF β activo es un heterotetrámero que consiste en dos receptores de TGF β I (TGF β RI) y dos receptores de TGF β II (TGF β RII). En algunas formas de realización, el DN-TGF β R es un DN-TGF β RII (es decir, una variante o mutante del receptor de TGF beta II). En algunas formas de realización, la resistencia es al efecto supresor de la señalización de TGF β es una célula inmunológica, tal como una célula T, donde dicho TGF β puede ser producido por células cancerosas o por otras células inmunológicas dentro de un entorno celular, tal como por células del estroma, macrófagos, células mieloides, células epiteliales, células asesinas naturales y semejantes. Los inhibidores de la señalización de TGF β son bien conocidos en la materia e incluyen, en un sentido no taxativo, un TGF β mutante que secuestra receptores y de esa manera inhiben la señalización, los anticuerpos que se unen a TGF β y/o receptores de TGF β (por ejemplo, lerdelimumab, metlimumab, fressolimumab y semejantes), proteínas de unión a TGF β solubles tales como porciones de receptores de TGF β que secuestran TGF β (por ejemplo, proteínas de fusión TGF β RII-Fc) u otros agentes de unión, tales como beta-glicanos. Cualquiera y todos los inhibidores de la señalización de TGF β conocidos se pueden usar en lugar de, o además de, DN-TGF β R (por ejemplo, DN-TGF β RII) que se describen en la presente. En algunas formas de realización, un DN-TGF β R carece de una

porción intracelular necesaria para una señalización mediada por TGF β , tal como el dominio intracelular completo, un dominio de señalización de quinasa, etc. Las construcciones de DN-TGF β R son bien conocidas en la materia (véase las formas de realización representativas, no limitantes, en Brand y col., (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 11500-11503; Weiser y col., (1993) *Mol. Cell Biol.*, 13: 7239-7247; Bollard y col., (2002) *Blood* 99: 3179-3187; publ. PCT WO 2009/152610; publ. PCT WO 2017/156484; Kloss y col., (2018) *Mol. Ther.*, 26: 1855-1866; publ. PCT WO 2019/089884; publ. PCT WO 2020/042647; y publ. PCT WO 2020/042648).

En algunas formas de realización, los productos de células inmunológicas (por ejemplo, células T modificadas) que comprenden una o más proteínas de unión (por ejemplo, TCR) que se describen en la presente son resistentes a una inmunosupresión mediada por β . Tal como se describió precedentemente y en otras partes en la presente, el TGF β es una citoquina inmunosupresora producida por células tumorales y células del microentorno tumoral. El TGF β inhibe la función y expansión de células T ayudantes Th1 y citotóxicas lo que da como resultado la supresión de las respuestas de células T específicas de tumores (Dahmani y Delisle (2018) *Cancers* 10:194). La señalización de TGF β en las células T puede ser anulada por la expresión de un receptor de TGF β tipo II dominante negativo (DN-TGF β RII) (Wieser y col., (1993) *Mol. Cell Biol.*, 13: 7239-7247; Bollard y col., (2002) *Blood* 99: 3179-3187). Tras la unión a TGF β , el TGF β RII de tipo salvaje se fosforila y de esa manera activa al TGF β RI e inicia la transmisión de señales intracelulares. Esta cascada de señalización está interrumpida en las células que expresan un TGF β RII truncado que carece del dominio quinasa intracelular (DN-TGF β RII), con lo cual las células se vuelven resistentes a una inhibición por el TGF β . El DN-TGF β RII bloquea la señalización de TGF β en las células T modificadas (tanto células CAR-T como TCR-T) (Bollard y col., (2002) *Blood* 99: 3179-3187; Foster y col., (2008) *J. Immunother.* 31: 500-505; Kloss y col., (2018) *Mol. Ther.*, 26: 1855-1866; Alabanza y col., (2022) *Front. Immunol.*, 13: 832645; Silk y col., (2022) *J. Immunol.*, 208: 169-180; Li y col., (2020) *Front. Oncol.*, 10: 1117). En un estudio representativo, una evaluación de células T específicas de EBV equipadas con DN-TGF β RII para el tratamiento del linfoma de Hodgkin mostró que las células T modificadas con DN-TGF β RII son seguras y eficaces (Bollard y col., (2018) *J. Clin. Oncol.*, 36: 1128-1139).

"Receptor de células T Kite" o "receptor de células T de comparación" se refiere a por lo

menos un receptor de células T de referencia (por ejemplo, "Kite-439") que se ha informado en la patente de los EE.UU. Nº 10.174.098 y las Solicitudes de Patente de los EE.UU. Nº 62/004.335; 61/846.167; y 61/846.161. En algunas formas de realización, el receptor de células T "Kite" o "de comparación" tiene secuencias que se establecen en la Tabla 2.

5 "Homóloga" como se usa en la presente, se refiere a la similitud de secuencia nucleotídica entre dos regiones de la misma hebra de ácido nucleico o entre regiones de dos hebras diferentes de ácido nucleico. Cuando una posición de residuo nucleotídico en ambas regiones está ocupada por el mismo residuo nucleotídico, entonces las regiones son homólogas en esa posición. Una primera región es homóloga a una segunda región si por lo menos una posición de residuo
10 nucleotídico de cada región está ocupada por el mismo residuo. La homología entre dos regiones se expresa en términos de la relación de las posiciones de residuo nucleotídico de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. A modo de ejemplo, una región que tiene la secuencia nucleotídica 5'-ATTGCC-3' y una región que tiene la secuencia nucleotídica 5'-TATGGC-3' comparte el 50% de homología. En algunas formas de realización, la primera región
15 comprende una primera parte y la segunda región comprende una segunda parte, por lo que, por lo menos aproximadamente el 50%, y, en otras formas de realización, por lo menos aproximadamente el 75%, 76%, 77%, 78%, 79 %, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo por lo menos aproximadamente 80% -100%, de las
20 posiciones de los residuos de nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. En algunas formas de realización, todas las posiciones de residuos nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico.

El término "virus del papiloma humano" o "HPV" se refiere a una familia de virus, cuya infección de algunos subtipos, como el HPV16 (NCBI Ref. Seq. NC_001526.4), se asocia a una
25 serie de trastornos, que incluyen cáncer. En algunos casos, dichos trastornos se asocian con la expresión de la oncoproteína E7 del HPV (por ejemplo, que se cree que se dirige a las vías de señalización de los supresores de tumores que regulan el control del crecimiento celular).

Tal como se lo usa en la presente, el término "antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉" o "antígeno peptídico HPV16 E7₁₁₋₁₉" o "antígeno peptídico que contiene HPV16 E7₁₁₋₁₉" o "epitope HPV16

E7₁₁₋₁₉" o "epitope peptídico HPV16 E7₁₁₋₁₉" o "bpéptido HPV16 E7₁₁₋₁₉" se refiere a una porción peptídica de una oncoproteína E7 de HPV16 producida de manera natural o sintética que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia YMLDLQPET.

El término "trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉" puede ser cualquier trastorno hiperproliferativo en el que el antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ está presente en un complejo MHC (por ejemplo, HLA) expresado por al menos algunas células hiperproliferativas en el sujeto. Algunos ejemplos de trastornos hiperproliferativos caracterizados por complejos HPV16 E7₁₁₋₁₉:HLA incluyen tumores malignos sólidos, tales como aquellos que se describen de manera detallada más adelante.

El término "respuesta inmunológica" incluye respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o células B. Algunos ejemplos de respuestas inmunológicas incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citoquinas y citotoxicidad celular. Además, el término respuesta inmunológica incluye respuestas inmunológicas que están afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células de respuestas por citoquinas, por ejemplo, macrófagos.

Una capacidad aumentada de estimular una respuesta inmunológica o el sistema inmunológico puede ser el resultado de una actividad agonista mejorada de los receptores coestimulantes de células T y/o una actividad antagonista mejorada de los receptores inhibidores. Una mayor capacidad de estimular una respuesta inmunológica o el sistema inmunológico puede reflejarse en ocasiones en un aumento de la EC₅₀ o el nivel máximo de actividad en un ensayo que mide una respuesta inmunológica, por ejemplo, un ensayo que mide los cambios en la liberación de citoquinas o quimioquinas, la actividad citolítica (determinada directamente en las células diana o indirectamente mediante la detección de CD107a o granzimas) y la proliferación. La capacidad de estimular una respuesta inmunológica o la actividad del sistema inmunológico puede ser mejorada en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 500% o más.

El término "agente inmunoterapéutico" puede incluir a cualquier molécula, péptido, anticuerpo u otro agente que pueda estimular el sistema inmunológico del huésped para generar

una respuesta inmunológica a una infección viral en el sujeto. Hay diversos agentes inmunoterapéuticos que son útiles en las composiciones y métodos que se describen en la presente.

El término "célula inmunológica" se refiere a cualquier célula del sistema inmunológico que se origina a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea, que da lugar a dos linajes principales: una célula progenitora mieloide (que da lugar a células mieloides como monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos); y una célula progenitora linfóide (que da lugar a células linfoides como las células T, las células B y las células asesinas naturales (NK)). Algunos ejemplos de células del sistema inmunológico incluyen una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T CD4 CD8 doble negativa, una célula T gd, una célula T reguladora, una célula asesina natural y una célula dendrítica. Los macrófagos y las células dendríticas se pueden denominar "células presentadoras de antígeno" o "APC", que son células especializadas que pueden activar las células T cuando un receptor del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de la APC complejoado con un péptido interactúa con un TCR en la superficie de una célula T.

Una "proteína aislada" se refiere a una proteína que está sustancialmente libre de otras proteínas, material celular, medio de separación, y medio de cultivo cuando se aísla de células o se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan de manera química. Una proteína "aislada" o "purificada" o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido del cual deriva la proteína de unión, el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido biomarcador o fragmento del mismo, en donde la proteína está separada de los componentes celulares de la célula de la cual se aísla o se produce de manera recombinante. En una forma de realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de una proteína biomarcadora o fragmento de la misma, que tiene menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteína no biomarcadora (que en la presente se denomina una "proteína contaminante") o, en algunas formas de realización, menos

de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos, o cualquier rango entre los mismos inclusive, por ejemplo por ejemplo menos de entre aproximadamente 1% y 5%, de proteína no biomarcadora. Cuando la proteína de unión, el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión o fragmento de la misma, por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de la misma, se produce de manera recombinante, puede estar sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos, o cualquier rango entre dichos valores inclusive, por ejemplo menos de entre aproximadamente 1% y 5%, del volumen del preparado de proteína.

Tal como se lo usa en la presente, el término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2C y otros similares) que está codificada por genes de región constante de la cadena pesada.

Tal como se lo usa en la presente, es la intención que el término " K_d " se refiera a la constante de equilibrio de disociación de una interacción proteína de unión-antígeno particular. La afinidad de unión de las proteínas de unión abarcadas por la presente invención se puede medir o determina mediante ensayos de unión de la proteína de unión a una diana estándar, por ejemplo, ensayos de competencia, ensayos de saturación o inmunoensayos estándar, tales como ELISA o RIA. Un valor de K_d relativamente más bajo indica una afinidad de unión relativamente más alta (por ejemplo, valores de K_d menores o iguales a aproximadamente 5×10^{-4} M (500 μ M) incluyen un valor de K_d de 1×10^{-4} M (100 μ M) y una K_d de 100 μ M indica una afinidad de unión relativamente mayor en comparación con una K_d de 500 μ M).

Un "kit" es cualquier producto (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende por lo menos un reactivo, por ejemplo, una sonda o molécula pequeña, para detectar y/o afectar específicamente la expresión de un marcador abarcado por la presente invención. El kit puede ser promocionado, distribuido, o vendido como una unidad para realizar los métodos abarcados por la presente invención. El kit puede comprender uno o más reactivos necesarios para expresar una composición útil en los métodos abarcados por la presente invención. En determinadas formas de realización, el kit además puede comprender un estándar de referencia, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para una proteína que no afecta o regula vías de señalización que controlan el crecimiento, división, migración, supervivencia o apoptosis de la célula. Un especialista en la

materia puede imaginar muchas de dichas proteínas de control, que incluyen, a título enunciativo no taxativo, marcas moleculares comunes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y beta-galactosidasa), proteínas no clasificadas en ninguna de las vías de que abarcan el crecimiento, división, migración, supervivencia o apoptosis celular por referencias de GeneOntology, o
 5 proteínas estándares interno ubicuas. Los reactivos en el kit pueden ser provistos en recipientes individuales o como mezclas de dos o más reactivos en un recipiente individual. Además, se pueden incluir materiales didácticos que describen el uso de las composiciones en el kit.

Tal como se lo usa en la presente, el término "ligado" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. La unión puede ser covalente o no covalente. La unión también puede ser
 10 genético (es decir, fusionado de manera recombinante). Dichas uniones se pueden lograr usando una amplia variedad de técnicas reconocidas en la técnica, tales como la conjugación química y la producción de proteínas recombinantes.

En algunas formas de realización, un "conector", puede hacer referencia a una secuencia de aminoácidos que conecta dos proteínas, polipéptidos, péptidos, dominios, regiones o motivos y
 15 puede proveer una función de espaciador compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de modo que el polipéptido que se obtiene como resultado retenga una afinidad de unión específica (por ejemplo, scTCR) a una molécula diana o retenga la actividad de señalización (por ejemplo, complejo TCR). En algunas formas de realización, un conector está compuesto por entre aproximadamente dos y aproximadamente 35 aminoácidos, por ejemplo, o entre
 20 aproximadamente cuatro y aproximadamente 20 aminoácidos o entre aproximadamente ocho y aproximadamente 15 aminoácidos o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 aminoácidos.

"Complejo mayor de histocompatibilidad " (MHC) se refiere a las glicoproteínas que suministran antígenos peptídicos a la superficie celular. Las moléculas de MHC de clase I son
 25 heterodímeros que tienen una membrana que abarca una cadena (con tres dominios a) y una microglobulina b2 asociada no covalentemente. Las moléculas de MHC de clase II están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, a y b, las cuales atraviesan la membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas de MHC de clase I transportan a la superficie celular péptidos que se originan en el citosol, donde las células T CD8⁺ reconocen un complejo de

péptido antígeno-MHC (pMHC). Las moléculas de MHC de clase II suministran péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde son reconocidos por las células T CD4⁺. El MHC humano se conoce como antígeno leucocitario humano (HLA).

Los términos “prevenir”, “previniendo”, “prevención”, “tratamiento profiláctico”, y similares se refieren a la reducción de la probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno, o condición en un sujeto, que no tiene, pero que tiene riesgo de o que es susceptible a desarrollar una enfermedad, trastorno, o condición.

El término “pronóstico” incluye una predicción del curso y resultado probable de una infección viral o la posibilidad de recuperación de la enfermedad. En algunas formas de realización, el uso de algoritmos estadísticos provee un pronóstico de una infección viral en un individual. Por ejemplo, el pronóstico puede ser cirugía, desarrollo de un subtipo clínico de una infección viral, desarrollo de uno o más factores clínicos, o recuperación de la enfermedad.

Tal como se usa en la presente, “porcentaje de identidad” entre secuencias de aminoácidos es sinónimo de “porcentaje de homología”, que se puede determinar usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268, modificado por Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. El algoritmo indicado está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un polinucleótido según se describe en la presente. Las búsquedas de proteínas por BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a un polipéptido de referencia. Para obtener alineaciones con faltas de coincidencia con fines de comparación, se utiliza el Gapped BLAST según se describe en Altschul y col. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente o material encapsulante de solvente líquido o sólido, relacionado con el transporte o acarreo del compuesto

sujeto desde un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico que no está presente de manera natural en la célula, por ejemplo una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que en la presente invención la referencia a las células no solo es a la célula objeto particular, sino que también abarca la progenie de dicha célula. Debido a que en generaciones sucesivas pueden producirse ciertas modificaciones debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero todavía está incluida dentro del alcance del término célula de acuerdo con la presente invención.

El término "respuesta del cáncer", "respuesta a la inmunoterapia" o "respuesta a los moduladores de la terapia de combinación de citotoxicidad/inmunoterapia mediada por células T" se refiere a cualquier respuesta del trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, cáncer) a un agente para tratar el cáncer, por ejemplo un modulador de la citotoxicidad mediada por células T y una inmunoterapia, preferiblemente para un cambio en la masa y/o volumen tumoral después del inicio de la terapia neoadyuvante o adyuvante. El término "terapia neoadyuvante" se refiere a un tratamiento administrado antes del tratamiento primario. Algunos ejemplos de terapia neoadyuvante pueden incluir quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. La respuesta del trastorno hiperproliferativo se puede evaluar, por ejemplo, para determinar su eficacia o en una situación neoadyuvante o coadyuvante, donde se puede comparar el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica con el tamaño y las dimensiones iniciales medidas por CT, PET, mamografía, ultrasonido o palpación. Las respuestas también se pueden evaluar mediante la medición del calibre o el examen patológico del tumor después de una biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de manera cuantitativa como cambio porcentual en el volumen del tumor o de manera cualitativa como "respuesta patológica completa" (pCR), "remisión clínica completa" (cCR), "remisión clínica parcial" (cPR), "clínica estable enfermedad" (cSD), "enfermedad clínica progresiva" (cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta del trastorno hiperproliferativo se puede realizar poco después del inicio de la terapia neoadyuvante o coadyuvante, por ejemplo, después de unas pocas horas, días, semanas o preferiblemente después de unos pocos meses. Un criterio de valoración típico para la evaluación

de la respuesta es luego de la finalización de la quimioterapia neoadyuvante o luego de la eliminación quirúrgica de las células tumorales residuales y/o el lecho tumoral. Por lo general, esto ocurre tres meses después del inicio de la terapia neoadyuvante. En algunas formas de realización, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos que se describen en la presente se puede determinar midiendo el índice de beneficio clínico (CBR, las siglas en inglés de *Clinical Benefit Rate*). El índice de beneficio clínico se mide determinando la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (CR), el número de pacientes que están en remisión parcial (PR) y el número de pacientes que tienen enfermedad estable (SD) a la vez en un punto de tiempo de por lo menos 6 meses desde el final de la terapia. La abreviatura de esta fórmula es $CBR = CR + PR + SD$ durante 6 meses. En algunas formas de realización, el CBR para un régimen terapéutico particular contra el cáncer es por lo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o más. Los criterios adicionales para evaluar la respuesta a las terapias contra el cáncer están relacionados con la "supervivencia", que incluye a todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, que también se conoce como supervivencia global (donde dicha mortalidad puede ser independiente de la causa o relacionada con el tumor); "Supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá a la recurrencia tanto localizada como a distancia); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia se puede calcular con referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, el momento del diagnóstico o el comienzo del tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para que incluyan la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo determinado y la probabilidad de recurrencia del tumor. Por ejemplo, para determinar los valores umbral apropiados, se puede administrar un régimen terapéutico contra el cáncer en particular a una población de sujetos y el resultado se puede correlacionar con las mediciones de biomarcadores que se determinaron antes de la administración de cualquier terapia contra el cáncer. La medida del resultado puede ser la respuesta de la patología a la terapia administrada en el entorno neoadyuvante. Como alternativa, las medidas de resultado, tales como la supervivencia global y la supervivencia libre de

enfermedad, se pueden controlar durante un período de tiempo para los sujetos que siguen la terapia del cáncer para los que se conocen valores de medición de biomarcadores. En ciertas formas de realización, las dosis administradas son dosis estándar conocidas en la técnica para agentes terapéuticos contra el cáncer. El período de tiempo durante el cual los sujetos son monitoreados puede variar. Por ejemplo, los sujetos se pueden controlar durante por lo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 meses. Los valores de umbral de medición de biomarcadores que se correlacionan con el resultado de una terapia contra el cáncer se pueden determinar usando métodos bien conocidos en el arte, tales como los que se describen en la sección de Ejemplos.

Como se indicó, los términos también pueden referirse a un pronóstico mejorado, por ejemplo, reflejado en un mayor tiempo hasta la recidiva, que es el período hasta la primera recidiva suprimiendo el segundo cáncer primario como un primer evento o muerte sin evidencia de recidiva, o un aumento de la supervivencia general, que es el período desde el tratamiento hasta la muerte por cualquier causa. Responder, o presentar una respuesta, significa que se alcanza un punto final beneficioso cuando se expone a un estímulo. Como alternativa, un síntoma negativo o perjudicial se minimiza, mitiga o atenúa con la exposición a un estímulo. Se apreciará que la evaluación de la probabilidad de que un tumor o sujeto muestre una respuesta favorable es equivalente a evaluar la probabilidad de que el tumor o sujeto no muestre una respuesta favorable (es decir, que exhiba una falta de respuesta o que no responda).

El término "resistencia" se refiere a una resistencia adquirida o natural de una muestra de cáncer o de un mamífero a una terapia contra el cáncer (es decir, que no responde o tiene una respuesta reducida o limitada al tratamiento terapéutico), por ejemplo presentando una respuesta a un tratamiento terapéutico reducida en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, por ejemplo de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive. La reducción en la respuesta se puede medir por comparación con la misma muestra de cáncer o mamífero antes de adquirir la resistencia, o por comparación con una muestra de cáncer diferente o un mamífero que se sabe que no presenta resistencia al tratamiento terapéutico. Una resistencia típica adquirida a la quimioterapia se denomina "resistencia a

múltiples fármacos." La resistencia a múltiples fármacos puede ser mediada por la glicoproteína P o puede ser mediada por otros mecanismos, o puede ocurrir cuando un mamífero está infectado con un microorganismo resistente a múltiples fármacos o una combinación de microorganismos. La determinación de la resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en el arte y dentro de la habilidad de un médico con una experiencia normal, por ejemplo, se puede medir mediante ensayos de proliferación celular y ensayos de muerte celular según se describe en la presente como "sensibilización." En algunas formas de realización, la expresión "invierte la resistencia" se refiere a que el uso de un segundo agente en combinación con una terapia primaria contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia o radioterapia) puede producir una disminución significativa en el volumen del tumor con un nivel de significación estadística (por ejemplo, $p < 0,05$) cuando se compara con el volumen tumoral de un tumor sin tratar en el caso de que la terapia del cáncer primario (por ejemplo, quimioterapia o radioterapia) sola no pueda producir una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral en comparación con el volumen tumoral del tumor sin tratar. Esto generalmente es válido para las mediciones del volumen del tumor realizadas en un momento en que el tumor sin tratar está creciendo logarítmicamente.

El término "muestra" usado para detectar o determinar la presencia, ausencia, o el nivel de por lo menos un biomarcador típicamente es tejido cerebral, fluido cerebroespinal, sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposiciones (por ejemplo, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido del cuerpo (por ejemplo, como se describe precedentemente en la definición de "fluidos corporales"), o una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia) tal como una muestra de intestino delgado o colon, o tejido de resección quirúrgica. En algunas formas de realización, los métodos que abarca la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la ausencia, presencia o el nivel de por lo menos un marcador en la muestra.

El término "sensibilizar" se refiere a alterar las células cancerosas o las células tumorales de una manera que permita un tratamiento más eficaz del cáncer asociado con una terapia contra el cáncer (por ejemplo, punto de control antiinmunológico, quimioterapia y/o radioterapia). En algunas formas de realización, las células normales no se ven afectadas en un grado que haga que las terapias dañen indebidamente a las células normales. Una sensibilidad aumentada o una

sensibilidad reducida a un tratamiento terapéutico se mide de acuerdo con un método conocido en el arte para el tratamiento en particular y los métodos que se describen a continuación en la presente, que incluyen, pero de manera no taxativa, ensayos de proliferación celular (Tanigawa y col. (1982) *Cancer Res.* 42: 2159-2164) y ensayos de muerte celular (Weisenthal y col. (1984) *Cancer Res.* 94: 161-173; Weisenthal y col. (1985) *Cancer Treat Rep.* 69: 615-632; Weisenthal y col., En: Kaspers GJL, Pieters R, Twentyman PR, Weisenthal LM, Veerman AJP, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Langhorne, PA: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432; Weisenthal (1994) *Contrib. Gynecol. Obstet* 19: 82-90). La sensibilidad o resistencia también se puede medir en animales midiendo la reducción del tamaño del tumor durante un período de tiempo, por ejemplo, 6 meses para humanos y 4-6 semanas para ratones. Una composición o un método sensibiliza la respuesta a un tratamiento terapéutico si el aumento de la sensibilidad del tratamiento o la reducción de la resistencia es del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, por ejemplo de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, en comparación con la sensibilidad o resistencia al tratamiento en ausencia de dicha composición o método. La determinación de la sensibilidad o resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en el arte y está dentro de la habilidad de un médico con una experiencia normal. Debe entenderse que cualquier método según se describe en la presente para mejorar la eficacia de una terapia contra el cáncer se puede aplicar por igual a métodos para sensibilizar células hiperproliferativas o cancerosas (por ejemplo, células resistentes) a la terapia contra el cáncer.

El término "molécula pequeña" es un término de la técnica e incluye a las moléculas que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1000 o un peso molecular menor de aproximadamente 500. En una forma de realización, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. En otra forma de realización, las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Algunos ejemplos de compuestos de moléculas pequeñas que se pueden seleccionar para determinar su actividad incluyen, pero de manera no taxativa, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, policétidos) (Cane y col. (1998) *Science* 282: 63-68) y bibliotecas de extractos de productos

naturales. En otra forma de realización, los compuestos son compuestos orgánicos no peptídicos pequeños. En una forma de realización adicional, una molécula pequeña no es biosintética.

El término "unión específica" se refiere a la unión de proteínas que se unen a un antígeno predeterminado. Normalmente, la proteína de unión se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menor o igual que aproximadamente 5×10^{-4} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-4} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-5} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-5} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-6} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-6} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-7} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-7} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-8} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-8} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-9} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-9} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-10} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-10} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-11} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-11} M, menor o igual que aproximadamente 5×10^{-12} M, menor o igual que aproximadamente 1×10^{-12} M, o aún menor, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo entre aproximadamente 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar, y valores similares, cuando se determina mediante un ensayo de unión, tal como la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento de ensayo BIAcore™ usando un antígeno de interés como analito y la proteína de unión como ligando. En algunas formas de realización, la proteína de unión se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es por lo menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, o 10,0 veces o mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "una proteína de unión que reconoce un antígeno" y "una proteína de unión específica para un antígeno" se usan de manera indistinta en la presente con el término "una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno." "Unión selectiva" es un término relativo que se refiere a la capacidad de una proteína de unión para discriminar la unión de un antígeno frente a otro, tal como un miembro de la familia o un antígeno diana en particular frente a un miembro de la familia relacionado o un antígeno diana. Por ejemplo, los datos analíticos provistos en la sección de Ejemplos demuestran que las proteínas de unión que se describen en la presente se unen

específicamente a epitopes inmunogénicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o se unen selectivamente a diversos epitopes relacionados (por ejemplo, epitopes inmunogénicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y secuencias estrechamente relacionadas) discriminando tales dianas de la gran mayoría de otros posibles epitopes disponibles en el genoma humano.

5 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, mamífero o ser humano sano, o cualquier animal, mamífero o ser humano que padezca un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. El término "sujeto" es sinónimo de "paciente".

10 El término "supervivencia" incluye a todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, que también se conoce como supervivencia global (donde dicha mortalidad puede ser independientemente de la causa o relacionada con el tumor); "supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá recurrencia tanto localizada como a distancia); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia se puede
15 calcular con referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, el momento del diagnóstico o el comienzo del tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para que incluyan la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo determinado y la probabilidad de recurrencia del tumor.

20 El término "efecto sinérgico" se refiere al efecto combinado de dos o más agentes (por ejemplo, un agente relacionado con HPV16 E7₁₁₋₁₉ según se describe en la presente y otra terapia para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉) que es mayor que la suma de la efectos separados de los agentes/terapias contra el cáncer solos.

25 Tal como se lo usa en la presente, el término "respuesta mediada por células T" se refiere a una respuesta mediada por células T, incluyendo a las células T efectoras (por ejemplo, células CD8⁺) y células T auxiliares (por ejemplo, células CD4⁺). Las respuestas mediadas por células T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de células T.

Un "polinucleótido transcritto" o "transcripto nucleotídico" es un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm, ARNnh, un ADNc, o un análogo de dicho ARN o ADNc) que es complementario a un

homólogo con todo el ARNm maduro o una porción del mismo hecho por transcripción de un ácido nucleico biomarcador y procesamiento postranscripcional normal (por ejemplo, corte y empalme), si lo hay, del transcripto de ARN, y transcripción reversa del transcripto del ARN.

Una "célula T" es una célula del sistema inmunológico que madura en el timo y produce receptores de células T (TCR). Las células T pueden ser naïve (no expuestas al antígeno; mayor expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA, y disminución de la expresión de CD45RO en comparación con T_{CM}), células T de memoria (T_M) (con experiencia de antígenos y de larga vida) y células efectoras (con experiencia de antígenos, citotóxicas). Las T_M se pueden dividir en subconjuntos de células T de memoria central (T_{CM}, mayor expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95, y disminución de la expresión de CD54RA en comparación con las células T naïve) y células T de memoria efectoras (T_{EM}, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con las células T naïve o T_{CM}). Las células T efectoras (T_E) se refieren a células T CD8+ citotóxicas con experiencia en antígenos que tienen una expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28 y son positivos para granzima y perforina en comparación con las T_{CM}. Otros ejemplos de células T incluyen células T regulatorias, tales como las células T regulatorias CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) y células Treg17, así como células Tr1, Th3, CD8⁺ CD28 y células T con actividad Qa-1 restringida.

Las células T convencionales, que también se conocen como Tconv o Teffs, tienen funciones efectoras (por ejemplo, secreción de citoquinas, actividad citotóxica, anti-autorreconocimiento y otras similares) para aumentar las respuestas inmunológicas en virtud de la expresión en las mismas de uno o más receptores de células T. Las Tcons o Teffs generalmente se definen como cualquier población de células T que no es una Treg e incluyen, por ejemplo, células T naïve, células T activadas, células T de memoria, Tcons en reposo o Tcons que se han diferenciado hacia, por ejemplo, los linajes Th1 o Th2. En algunas formas de realización, los Teffs son un subconjunto de células T no Treg. En algunas formas de realización, las Teff son Teff CD4⁺ o Teff CD8⁺, tales como células T auxiliares CD4⁺ (por ejemplo, Th0, Th1, Tfh o Th17) y células T citotóxicas CD8⁺. Como se describe adicionalmente en la presente, las células T citotóxicas son células T CD8⁺. Las "Tcons naïve" son células T CD4⁺ que se han diferenciado en la médula ósea y se han sometido con éxito a procesos positivos y negativos de selección central

en el timo, pero que aún no han sido activadas por exposición a un antígeno. Las Tcons naïve se caracterizan comúnmente por la expresión en superficie de L-selectina (CD62L), ausencia de marcadores de activación como CD25, CD44 o CD69, y ausencia de marcadores de memoria como CD45RO. Por lo tanto, se cree que las Tcons naïve son inactivas y no se dividen, requiriendo interleuquina-7 (IL-7) e interleuquina-15 (IL-15) para la supervivencia homeostática (véase por lo menos, WO 2010/101870). La presencia y actividad de dichas células no son deseables en el contexto de la supresión de respuestas inmunológicas. A diferencia de las Treg, las Tcon no son anérgicas y pueden proliferar en respuesta a la activación del receptor de células T basado en antígenos (Lechler y col. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356: 625-637)

Las células "T efectoras" ("T_{eff}" o "T_E") se refieren a las células T (por ejemplo, Células T CD4+ y CD8+) con actividades citolíticas, así como a las células T auxiliares (Th), que secretan citoquinas y activan y dirigen a otras células inmunológicas, pero no incluye a las células T regulatorias (células Treg).

"Receptor de células T" o "TCR" se refiere a un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (que tiene un dominio de unión variable, un dominio constante, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta; véase, por ejemplo, Janeway y col. (1997) *Curr. Biol. Publ.* 4:33) que es capaz de unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un péptido antigénico unido a un receptor MHC. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble y generalmente está compuesto por un heterodímero que tiene cadenas alfa y beta (que también se conocen como TCR α y TCR β , respectivamente), o cadenas γ y δ (que también se conocen como TCR γ y TCR δ , respectivamente). Al igual que las inmunoglobulinas (por ejemplo, Anticuerpos), la parte extracelular de las cadenas de TCR (por ejemplo, cadena α y cadena β) contienen dos dominios de inmunoglobulina: un dominio variable (por ejemplo, dominio variable de la cadena α o V α y un dominio variable de la cadena β o V β ; típicamente los aminoácidos 1 a 116 en base a la numeración de Kabat (Kabat y col. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 5ª ed.) en el extremo N-terminal, y un dominio constante (por ejemplo, un dominio constante de cadena α o C α , típicamente los aminoácidos 117 a 259 basado en Kabat, un dominio constante de cadena β o C β , típicamente los aminoácidos 117 a 295 basado

en Kabat) en el Extremo C-terminal y adyacente a la membrana celular. También, al igual que las inmunoglobulinas, los dominios variables contienen regiones determinantes de complementariedad ("CDR", que también se denominan regiones hipervariables o "HVR") separadas por regiones de marco ("FR") (véase, por ejemplo, Fores y col. (1990) Proc. Natl. Acad Sci. USA. 87: 9138; Chothia y col. (1988) EMBO J. 7: 3745; Lefranc y col. (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55). En algunas formas de realización, un TCR se encuentra en la superficie de una célula T (o linfocito T) y se asocia con el complejo CD3. La fuente de un TCR abarcado por la presente invención puede pertenecer a diversas especies animales, por ejemplo puede ser un ser humano, ratón, rata, conejo u otro mamífero.

Debe entenderse que el término "receptor de células T" o "TCR" abarca a los TCR completos, así como a las partes de unión al antígeno o sus fragmentos de unión al antígeno. En algunas formas de realización, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, que incluye los TCR en la forma $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. En algunas formas de realización, el TCR es una parte de unión al antígeno que es menor que un TCR de longitud completa pero que se une a un péptido específico unido en una molécula de MHC, por ejemplo, que se une a un complejo de MHC-péptido. En algunos casos, una parte de unión al antígeno o un fragmento de un TCR puede contener solo una parte de los dominios estructurales de un TCR de longitud completa o intacto, pero aún es capaz de unirse al epítopo peptídico, como el complejo MHC-péptido, al cual se une el TCR completo. En algunos casos, una parte de unión al antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tales como la cadena variable α y la cadena variable β de un TCR, que es suficiente para formar un sitio de unión para unirse a un complejo péptido-MHC específico. Generalmente, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) relacionadas con el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

Nomenclatura establecida por el Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT) (véase también Scaviner y Lefranc (2000) Exp. Clin. Immunogenet. 17: 83-96 y 97-106; Folch y Lefranc (2000) Exp. Clin. Immunogenet, 17: 107-114; T Cell Receptor Factsbook ", (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8). El IMGT provee secuencias únicas que se utilizan para describir un TCR, y las secuencias que se describen en la presente se pueden identificar por referencia a dichas secuencias únicas que se proveen en la presente. Las

secuencias de TCR están disponibles públicamente en la base de datos IMGT en imgt.org.

Tal como se describió anteriormente, los TCR heterodiméricos alfa/beta nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una pequeña región de diversidad entre las regiones variable y de unión, pero esta región de diversidad frecuentemente se considera parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) hipervariables incluidas en una secuencia de marco. Se sabe que CDR3 es el principal mediador del reconocimiento de antígenos. Hay diversos tipos de regiones variables de la cadena alfa (V_α) y diversos tipos de regiones variables de la cadena beta (V_β) que se distinguen por su marco, secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 definida parcialmente. En la nomenclatura IMGT, los tipos de V_α se denominan mediante un número TRAV único. Por ejemplo, "TRAV4" define a una región V_α de TCR que tiene un marco único y secuencias CDR1 y CDR2, y una secuencia CDR3 que está definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva de un TCR a otro pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de TCR a TCR. De manera similar, "TRBV2" define una región V_β de TCR que tiene un marco y secuencias CDR1 y CDR2 únicos, pero con una secuencia CDR3 sólo definida parcialmente. Se sabe que dentro de los loci alfa y beta, existen respectivamente 54 genes variables alfa, de los cuales 44 son funcionales, y 67 genes variables beta, de los cuales 42 son funcionales.

Las regiones de unión del TCR se definen de manera similar por la nomenclatura única IMGT TRAJ y TRBJ, y las regiones constantes por la nomenclatura IMGT TRAC y TRBC. La región de diversidad de la cadena beta se denomina en la nomenclatura IMGT por la abreviatura TRBD y, como se mencionó, las regiones TRBD/TRBJ concatenadas frecuentemente se consideran juntas como la región de unión.

Los conjuntos de genes que codifican las cadenas alfa y beta del TCR se encuentran en diferentes cromosomas y contienen segmentos de genes V, (D), J y C separados, que se unen por reordenamiento durante el desarrollo de las células T. Esto conduce a una diversidad muy alta de las cadenas alfa y beta de las células T debido al gran número de posibles eventos de recombinación que ocurren entre los 54 genes variables alfa de TCR y los 61 genes alfa J o entre

los 67 genes variables beta, dos genes beta D y 13 genes beta J. El proceso de recombinación no es preciso e introduce una mayor diversidad dentro de la región CDR3. Cada gen de las regiones variables alfa y beta también puede comprender variantes alélicas, designadas en la nomenclatura IMGT como TRAVxx*01 y*02, o TRBVx-x*01 y*02 respectivamente, aumentando así aún más la magnitud de la variación. De la misma manera, algunas de las secuencias TRBJ tienen dos variaciones conocidas. (Téngase en cuenta que la ausencia de un calificador "*" se refiere a que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante). Se ha estimado que el repertorio natural de TCR humanos que se obtuvieron como resultado de la recombinación y la selección tímica comprende aproximadamente 10^6 secuencias de cadena beta únicas, determinadas a partir de la diversidad de CDR3 (Arstila y col. (1999) *Science* 286: 958-961) y podría ser incluso superior (Robins y col. (2009) *Blood* 114: 4099-4107). Se estima que cada cadena beta se aparea con por lo menos 25 cadenas alfa diferentes, generando así una mayor diversidad (Arstila y col. (1999) *Science* 286: 958-961).

Por lo tanto, el término "dominio variable alfa de TCR" se refiere a la concatenación de las regiones TRAV y TRAJ; a una región TRAV solamente; o a una región TRAV y una región TRAJ parcial, y el término dominio constante alfa de TCR se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia TRAC truncada o de longitud completa C-terminal. De manera similar, el término "dominio variable beta de TCR" se refiere a la concatenación de las regiones TRBV y TRBD/TRBJ; solo a las regiones TRBV y TRBD; solo a las regiones TRBV y TRBJ; o a las regiones TRBV y TRBD parcial y/o TRBJ, y el término dominio constante beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia TRBC truncada o de longitud completa C-terminal. Esta nomenclatura de dominio variable alfa de TCR y dominio variable de TCR beta se aplica de manera similar a los dominios variables de las cadenas delta de TCR gamma y TCR, respectivamente, para los TCR gamma/delta. Un especialista en la materia puede obtener secuencias de genes TRAV, TRAJ, TRAC, TRBV, TRBJ y TRBC, por ejemplo mediante la base de datos IMGT disponible públicamente.

El término "complejo TCR" se refiere a un complejo formado por la asociación de CD3 con TCR. Por ejemplo, un complejo TCR puede estar compuesto por una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ , un homodímero de cadenas CD3 ζ , una cadena TCR α y una cadena

TCR β . Como alternativa, un complejo de TCR puede estar compuesto por una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ , un homodímero de cadenas CD3 ζ , una cadena TCR γ y una cadena TCR δ .

El término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto local o sistémico en animales, en particular en mamíferos, y más particularmente en seres humanos causados por una sustancia farmacológicamente activa. El término significa entonces cualquier sustancia destinada al uso en el diagnóstico, la cura, alivio, tratamiento o prevención de la enfermedad o para mejorar el desarrollo y las condiciones físicas o mentales deseables en un animal o ser humano.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a la cantidad de una sustancia que produce algún efecto que se desea, por ejemplo un efecto terapéutico local o sistémico deseado, en por lo menos una subpoblación de células de un animal con una razonable relación beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia dependerá del índice terapéutico, la solubilidad, la farmacocinética, la vida media y semejantes. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos objeto se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ y la DE₅₀. En algunas formas de realización, se usan composiciones que exhiben grandes índices terapéuticos. En algunas formas de realización, la LD₅₀ (dosis letal) se puede medir y puede estar reducido, por ejemplo, en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. De manera similar, se puede medir la DE₅₀ (es decir, la concentración que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) y puede ser, por ejemplo, mayor en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. Además, de manera similar, se puede medir la IC₅₀ y puede ser, por ejemplo, mayor en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica de las células T en un ensayo se puede incrementar en por

lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aún en un 100%. En otra forma de realización, se puede lograr una disminución de por lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aún un 100% de la carga viral.

5 El término "tratar" se refiere al manejo terapéutico o la mejora de una condición (por ejemplo, una enfermedad o trastorno) de interés. El tratamiento puede incluir, pero de manera no taxativa, a la administración de un agente o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) a un sujeto. El tratamiento se realiza típicamente en un esfuerzo por alterar el curso de una enfermedad (término que se usa para indicar cualquier enfermedad, trastorno, síndrome o

10 condición no deseable que justifique o justifique potencialmente la terapia) de una manera beneficiosa para el sujeto. El efecto del tratamiento puede incluir revertir, aliviar, reducir la gravedad, retrasar el inicio, curar, inhibir el progreso y/o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de la enfermedad o uno o más síntomas o manifestaciones de la enfermedad. Los efectos deseados del tratamiento incluyen, pero en un sentido no taxativo, prevenir la aparición o

15 la recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de toda consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución del índice de progreso de la enfermedad, alivio o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejora de la prognosis. El agente terapéutico se le puede administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad con relación a un miembro de la

20 población general. En algunas formas de realización, el agente terapéutico se le puede administrar a un sujeto que ha padecido una enfermedad pero que ya no muestra evidencia de la misma. El agente se puede administrar, por ejemplo, para reducir la probabilidad de recurrencia de una enfermedad evidente. El agente terapéutico se puede administrar de manera profiláctica, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación de una enfermedad. "Tratamiento

25 profiláctico" se refiere a proveer tratamiento médico y/o quirúrgico a un sujeto que no ha desarrollado una enfermedad o no muestra evidencia de una enfermedad, por ejemplo, para reducir la probabilidad de que ocurra la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad en caso de que ocurra. Es posible que se haya detectado que el sujeto se encuentra riesgo de desarrollar la enfermedad (por ejemplo, presenta un mayor riesgo con relación a la población

general) o que presenta un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad.

El término "falta de respuesta" incluye la refractividad de las células cancerosas a la terapia o la refractividad a la estimulación de las células Terapéuticas, por ejemplo las células
 5 inmunológicas, por ejemplo, a la estimulación mediante un receptor activador o una citoquina. La falta de respuesta se puede producir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o a la exposición a altas dosis de antígeno. Tal como se lo usa en la presente, los términos "anergia" o "tolerancia" incluyen la refractividad para la activación de la estimulación mediada por receptor. Dicha refractividad es generalmente específica del antígeno y persiste después de que ha cesado
 10 la exposición al antígeno que genera tolerancia. Por ejemplo, la anergia en las células T (en oposición a la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citoquinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de las células T ocurre cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (una señal mediada por un receptor de células T o CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimulante) En estas condiciones, la reexposición de las
 15 células al mismo antígeno (incluso si la reexposición se produce en presencia de un polipéptido coestimulante) da como resultado una falta de producción de citoquinas y, por lo tanto, un fracaso de la proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citoquinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de las células T también se puede observar por la falta de producción de IL-2 por los células T medida por ELISA o por un ensayo de
 20 proliferación usando una línea celular indicadora. Como alternativa, se puede usar una construcción de gen informante. Por ejemplo, las células T anérgicas no pueden iniciar la transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador 5' del gen IL-2 o por un multímero de la secuencia AP1 que puede encontrarse dentro del potenciador (Kang y col. (1992) *Science* 257: 1134).

25 Los términos "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una proteína de unión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, una cadena de TCR α o una cadena β (o una cadena γ y una cadena δ para TCRs $\gamma\delta$)) que participa en la unión de la proteína de unión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, TCR) al antígeno. Los dominios variables de la cadena α y la cadena β (V_α y V_β , respectivamente) de un TCR nativo generalmente

5 tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones de marco conservadas (FR) y tres CDR. El dominio V_α está codificado por dos segmentos de ADN separados, el segmento de gen variable y el segmento de gen de unión (V-J); el dominio V_β está codificado por tres segmentos de ADN separados, el segmento de genes variables, el segmento de genes de diversidad y el segmento de genes de unión (V-D-J). Un solo dominio V_α o V_β puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los TCR que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio V_α o V_β de un TCR que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios V_α o V_β complementarios, respectivamente.

10 El término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. En algunas formas de realización, un vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. En algunas formas de realización, los vectores son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en la presente "vectores de expresión". En general, 15 los vectores de expresión que son útiles en las técnicas de ADN recombinante frecuentemente se encuentran en forma de "plásmidos" que se refieren generalmente a bucles circulares de ADN de doble hebra, que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan de manera indistinta ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más comúnmente. Sin embargo, como apreciarán los especialistas en la materia, es la intención que la presente invención incluya otras formas de vectores de expresión 20 que cumplen funciones equivalentes y más adelante serán conocidas en la materia.

Existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias nucleotídicas que pueden codificar para la proteína, según lo definido por el código genético (mostrado a continuación). De manera similar, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico 25 particular y la secuencia de aminoácidos codificada por ese ácido nucleico, según lo definido por el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

	Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
	Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
	Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
	Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
5	Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
	Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
	Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
	Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
	Histidina (His, H)	CAC, CAT
10	Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
	Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
	Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
	Metionina (Met, M)	ATG
	Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
15	Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
	Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
	Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
	Triptofano (Trp, W)	TGG
	Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
20	Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
	Señal de terminación (final)	TAA, TAG, TGA

Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, por la cual, para la mayoría de los aminoácidos usados para construir proteínas, se puede emplear más de un triplete de nucleótidos codificante (ilustrado precedentemente). Por lo tanto, un número de diferentes secuencias nucleotídicas pueden codificar para una dada secuencia de aminoácidos. Dichas secuencias nucleotídicas son consideradas funcionalmente equivalentes ya que resultan en la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (a pesar de que ciertos organismos pueden traducir algunas secuencias de manera más eficaz que

otros). Además, ocasionalmente, se puede encontrar una variante metilada de una purina o pirimidina en una dada secuencia nucleotídica. Dichas metilaciones no afectan a la relación codificante entre el codón trinucleotídico y el correspondiente aminoácido.

En vista de lo anterior, se puede usar una secuencia nucleotídica de un ADN o ARN que codifica para un ácido nucleico biomarcador (o cualquier parte del mismo) para derivar la secuencia de aminoácidos del polipéptido, usando el código genético para traducir el ADN o ARN a una secuencia de aminoácidos. De manera similar, para la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se pueden deducir secuencias nucleotídicas correspondientes que pueden codificar para el polipéptido a partir del código genético (el cual, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos dada). Por lo tanto, la descripción y/o divulgación en la presente de una secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido se debe considerar que también incluye la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica. De manera similar, descripción y/o divulgación de una secuencia de aminoácidos del polipéptido en la presente se debe considerar que también incluye la descripción y/o divulgación de todas las posibles secuencias nucleotídicas que pueden codificar la secuencia de aminoácidos.

II. Proteínas de unión

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen proteínas de unión que se unen (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula del MHC (por ejemplo, una molécula del MHC de clase I). En algunas formas de realización, la proteína de unión es capaz de unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC) con una K_d menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-4} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-5} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-5} M, menor que o igual a aproximadamente 5×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-9} M, menor o igual a

aproximadamente 1×10^{-9} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-12} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-12} M, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar y valores similares. En algunas formas de realización, la molécula del MHC comprende una cadena alfa del MHC que es un serotipo HLA-A*02 de HLA. En algunas formas de realización, el alelo HLA se selecciona entre el grupo que consiste en los alelos HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 y HLA-A*0207. En una forma de realización específica, el alelo HLA es HLA-A*0201. En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente se modifican, aíslan y/o purifican genéticamente.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión tienen una mayor afinidad de unión por el péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC) que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR Kite según se describe en la presente). Por ejemplo, las proteínas de unión pueden tener una afinidad de unión por el péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉-MHC (pMHC) que es por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, 5000 veces, 10000 veces, 50000 veces, 100000 veces, 500000 veces, 1000000 veces, o más, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo a entre 1,2 veces y 2 veces, mayor que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR Kite según se describe en la presente).

En algunas formas de realización, la proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citoquinas y/o destrucción citotóxica que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR Kite según se describe en la presente) cuando se pone en contacto con células diana con expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un cierto nivel o por debajo. Por ejemplo, en algunas formas de realización de cualquiera de los aspectos que se describen en la presente, el nivel de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se puede expresar en términos de transcritos por millón y puede ser, por

ejemplo, menor o igual a aproximadamente 1000 transcriptos por millón de transcriptos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo a entre menor o igual a aproximadamente 1 000 TPM y menor o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se denomina "expresión heterocigota" que significa entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo a 32 TPM o 1-32 TPM. Una expresión más alta es 36 TPM y más. Tal como se describe más adelante en la presente, los TPM se miden de acuerdo con técnicas bien conocidas, como ARN-Seq, y los datos de expresión génica en TPM son bien conocidos en la técnica para una variedad de líneas celulares, tipos de tejidos y elementos similares (véase, por ejemplo, la Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) en la World Wide Web en portals.broadinstitute.org). En algunas formas de realización, la proteína de unión induce un aumento de por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces o más, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo a entre 1,2 veces y 2 veces, de la expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR de Kite según se describe en la presente) cuando se pone en contacto con células diana que expresan el epítipo peptídico HPV16 E7₁₁₋₁₉.

En algunas formas de realización, la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se detecta usando secuenciación de ARN (RNA-seq). La RNA-seq generalmente comprende los siguientes pasos:

obtener una muestra que contiene material genético, aislar el ARN total de la muestra que se obtuvo, preparar una biblioteca de ADNc amplificado del ARN total, secuenciar la biblioteca de ADNc amplificado y analizar y perfilar el ADNc amplificado para evaluar la nivel de expresión de diferentes transcripciones. La muestra puede ser una población de células, una muestra de tejido, una muestra de biopsia, un cultivo celular o una sola célula. El ARN total se puede aislar de la muestra biológica usando cualquier método conocido en la materia. En ciertas formas de realización, el ARN total se extrae del plasma. La extracción de ARN plasmático se describe en Enders y col., "The Concentration of Circulating Corticotropin-Releasing Homer mRNA in Material Plasma Is Inclined in Preclampsia", *Clinr*. Como se describe allí, el plasma recogido después del paso de centrifugación se mezcla con reactivo Trizol LS (Invitrogen) y cloroformo. La mezcla se centrifuga y se transfiere la capa acuosa a un tubo nuevo. Se agrega etanol a esta capa acuosa. Luego, la mezcla se coloca en una mini columna RNeasy (Qiagen) y se procesa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

En algunas formas de realización, la secuencia de ARN según se describe en la presente incluye el paso de preparar ADNc amplificado a partir de ARN total. Por ejemplo, se prepara ADNc y la muestra de ARN aislada se amplifica aleatoriamente sin dilución, o la mezcla de material genético en el ARN aislado se dispersa en muestras de reacción individuales. En ciertas formas de realización, la amplificación se inicia aleatoriamente en el extremo 3' y en todo el transcriptoma de la muestra para amplificar tanto el ARNm como los transcriptos no poliadenilados. De esta manera, los productos de amplificación de ADNc de doble hebra se optimizan para la generación de bibliotecas de secuenciación para plataformas de secuenciación de nueva generación. Un kit apropiado para la amplificación de ADNc mediante el método abarcado por la presente invención incluye, por ejemplo, Ovation® RNA-Seq System.

En algunas formas de realización, la secuencia de ARN según se describe en la presente incluye el paso de secuenciar el ADNc amplificado. Para secuenciar la mezcla de ADNc amplificado se puede usar cualquier método de secuenciación conocido, incluyendo el método de secuenciación de una sola molécula. En ciertas formas de realización, el ADNc amplificado se secuencia mediante secuenciación rápida del transcriptoma completo. La secuenciación completa del transcriptoma se puede realizar utilizando varias plataformas de secuenciación de nueva

generación, como la plataforma Illumina® Genome Analyzer, la plataforma de secuenciación ABI SOLiD™ o la plataforma de secuenciación 454 de Life Science.

En algunas formas de realización, la secuenciación de ARN según se describe en la presente comprende además realizar el recuento y análisis digital del ADNc. El número de
5 secuencias amplificadas para cada transcripción en la muestra amplificada se puede cuantificar mediante lectura de secuencias (una lectura por hebra amplificada). En algunas formas de realización, la transcripción por millón (TPM) se usa para cuantificar el nivel de expresión de una transcripción particular. El TPM se puede calcular como se muestra en Wagner y col. (2012) Theory in BioSciences 131: 281-285, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en toda su
10 extensión.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión no se unen a un complejo péptido-MHC (pMHC), opcionalmente donde el péptido deriva de SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 o XM_00172256.

En algunas formas de realización, la proteína de unión no se une a un complejo SPTA1-,
15 MPL-, HERC1-, CPAMD8-, INTS4-, NUTM1- ni/o XM_00172256-péptido-MHC (pMHC).

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de la cadena alfa del TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de
20 identidad con una secuencia de la cadena TCR alfa que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias del TCR alfa de la Tabla 1; y/o b) una secuencia de la cadena beta del TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad con una secuencia de la cadena beta del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las
25 secuencias de la cadena beta del TCR de la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de la cadena alfa del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de cadena alfa del TCR de la Tabla 1; y/o b) una secuencia de la cadena beta del TCR que se

selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta del TCR de la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia del dominio variable de la cadena alfa (V_α) del TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80
5 %, 81 %, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o más de identidad con una secuencia del dominio variable de la cadena alfa (V_α) del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de dominio V_α del TCR de la Tabla 1; y/o b) una secuencia del dominio variable de la cadena beta (V_β) del TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90
10 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad con una secuencia del dominio variable de la cadena beta (V_β) del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias del dominio V_β del TCR de la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia
15 del dominio variable de la cadena alfa (V_α) del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias del dominio V_α del TCR de la lista de la Tabla 1; y/o b) una secuencia del dominio variable de la cadena beta (V_β) del TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de dominio V_β del TCR de la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente
20 incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2)) secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena alfa de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de
25 la CDR de la cadena alfa de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de TCR que se mencionan en la Tabla 1. Se cree que la CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por lo que, en algunas formas de realización, se provee la proteína de unión que comprende una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR y/o una CDR3 sola de una

cadena beta de TCR que se menciona en la Tabla 1, donde cada CDR3 tiene una homología de secuencia según se indica en este párrafo.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2) secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena beta de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de la CDR de la cadena beta de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la CDR de la cadena beta de TCR que se mencionan en la Tabla 1. Según se describió anteriormente, se cree que CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por lo que, en algunas formas de realización, se provee la proteína de unión que comprende una CDR3 sola de una cadena beta de TCR y/o una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR que se menciona en la Tabla 1, donde cada CDR3 tiene una homología de secuencia según se indica en este párrafo.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) región determinante de la complementariedad (CDR) de las cadenas alfa del TCR que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) región determinante de la complementariedad (CDR) de las cadenas TCR beta que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) una secuencia de la región constante de la cadena alfa (C α) de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la C α de TCR que se menciona

en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) una secuencia de la región constante de la cadena beta ($C\beta$) de TCR que tiene por lo menos
 5 aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la $C\beta$ de TCR que se menciona en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) una secuencia de la
 10 región constante de la cadena alfa ($C\alpha$) de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la $C\alpha$ de TCR que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) una secuencia de la región constante de la cadena beta ($C\beta$) de TCR que se selecciona entre el grupo
 15 que consiste en las secuencias de la $C\beta$ de TCR que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente comprenden una región constante quimérica, humanizada, humana, de primate o de roedor (por ejemplo, de rata o ratón). Por ejemplo, una región variable humana se puede quimerizar con una región constante murina o una región variable murina se puede humanizar con una región
 20 constante humana y/o regiones flanqueantes humanas. En algunas formas de realización, las regiones constantes se pueden mutar para modificar la funcionalidad (por ejemplo, mediante introducción de sustituciones de cisteína no naturales en ubicaciones de residuos opuestos en cadenas alfa y beta del TCR para proveer enlaces disulfuro útiles para aumentar la afinidad entre las cadenas alfa y beta de TCR). De manera similar, se pueden realizar mutaciones en el dominio
 25 transmembrana de la región constante para modificar la funcionalidad (por ejemplo, aumentar el carácter hidrofóbico introduciendo una sustitución no natural de un residuo con un aminoácido hidrofóbico). En algunas formas de realización, se pueden realizar mutaciones en la región constante para aumentar la expresión en la superficie celular.

Tabla 1

Secuencia E7-11-28 WT (las mismas CDR que "E7-11-28 MGTM")

Cadena alfa:

5 TRAV25/TRAJ37/TRAC

Secuencia de ADN de la cadena alfa

ATGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCC
 AGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTAC
 10 TGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACC
 CTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTC
 CAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAAGCAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGT
 GGGCACCTACTTCTTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAG
 GGACAACCTTTACAAGTAAACCAGatattcagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtac
 15 aagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctaga
 catgaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatt
 attccagaagacaccttctccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggtcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaact
 ttcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgctgcggctgtggtccagc

20 Secuencia de proteína de la cadena alfa

MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVVQEGEDFTTYCNSSTLSNIQWYKQRPGG
 HPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGIGSSNTGKLIFGQGTTL
 QVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipe
 dtffpsesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrillkvagfnllmtlrlwss

25

Cadena beta:

TRBV2/TRBJ2-7/TRBC1

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCG
 AGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGAAGTCAAGTGGGGCAAGAAGTCATTCTG
 CGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAA
 GTGGAATTCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGAC
 5 CAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAATT
 GAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTCGCGTTTCATATGAGCAATATTTTCGGGC
 CGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGaggacctgaacaaggtgttccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaag
 cagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttctccctgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatg
 ggaaggaggtgcacagtgggtgcagcacggacccgcagcccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatactgcctgagc
 10 agccgcctgagggctcggccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctcctggagaatgac
 gagtggaccaggatagggccaaaccgctaccagatcgctcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcggtgt
 cctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggggaaggccaccctgtatgctgtgctggtcagcgccctgtgt
 tgatggccatggtcaagagaaaggatttc

15 Secuencia de proteína de la cadena beta

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
 VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTR
 LTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstdpqpplkeqpalndsryclssrlvsatfw
 qnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdf

20

Secuencia de E7-11-176 de tipo salvaje

Cadena alfa:

TRAV29DV5/TRAJ41/TRAC

25 Secuencia de ADN de la cadena alfa

Atggccatgctgctgggagccagcgtgctgattctttggctccagcctgactgggtcaacagccagcagaagaacgacgatca
 gcaagtgaagcagaacagccccagcctgagcgtgcaagaaggcagaatctcatcctgaactgcgactacaccaactctatgttcga
ctactttcctgtggtacaagaagtaccccgccgagggaccaccttctgatcagccatcagctccatcaaggacaagaacgaggacgg
 ccggttcaccgtgtttctgaacaagagcgccaagcacctgagcctgcacatcgtgccttctcagcctggggattccgccgtgtattttcgC

CCGCAAAAAATTCAAATTCAGGTTATGCCCTCAACTTTGGCAAAGGCACCTCGCTGTTGGTCA
 CACCCCatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgatttg
 attctcaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggcttatggacttcaagagc
 aacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccag
 5 cccagaaagttcctgtgatgtcaagctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggtcc
 gaatcctcctcctgaaagtgccgggttaatctgctcatgacgctgaggctgtgtccagc

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT**NSMFDY**FL
 10 WYKKYPAEGPTFLIS**ISSIKDK**NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF**CAAKNSNSGYA**
LNFGKGTSLLVTPHiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqksdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfa
 canafnnsiipedtffpsesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrilllkvagfnllmtrlwss

15 Cadena beta:

TRBV24-1/TRBJ2-6/TRBC1

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGG
 20 ACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACCGGCAAGCGGATCATGCTG
 GAATGCAGCCAGACC**AAGGGCCACGACCGG**ATGTACTGGTACAGACAGGATCCAGGACTGG
 GCCTGCAGCTGATCTACTAC**AGCTTCGACGTGAAGGAC**ATCAACAAGGGCGAGATCAGCGAC
 GGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAAGCGCTATCCC
 CAACCAGACTGCCCTGTACTTCT**TGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCCGGCGCCAACGTTCTTA**
 25 **CCTTT**GGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGCTGGaggacctgaacaagggtgtccacccgaggctgctgtgttg
 agccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttctccctgaccacgtggagctgag
 ctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctcaaggagcagcccgccctcaatgactcca
 gatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggct
 ctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgctcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtg

gctttacctcgggtgtcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggggaaggccaccctgtatgtgtgtgtgt
cagcgcccttggtgatggccatggtcaagagaaaggatttc

Secuencia de proteína de la cadena beta

5 MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQT**KGHDR**MYWYRQDPG
LGLQLIYY**SFDVKD**INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYF**CATSDRSSGANVLTF**GA
GSRLTVLEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstdpqpkeqpalndsryclssrlrvs
atfwqnprnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdf

10

Secuencia de E7-11-194 de tipo salvaje

Cadena alfa:

TRAV25/TRAJ37/TRAC

15

Secuencia de ADN de la cadena alfa

Atgctgtgatcacctccatgctgggtgtgtggtgagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctcagtac
cagcacgtgcaagaaggcgaggacttcaccacactgcaacagcagc**accacactgagcaac**atccagtggtacaagcagcggc
ctggcggacaccctgtgttctgatccag**ctggtcaagtcggcggaagtga**aagaagcagaagcggctgacctccagttcggcgaggc
caagaagaacagcagcctgcacatcacgccacacagaccacagatgtgggcacctacttc**TGCGCTGGGCTCGGTTCC**
20 **TCTAATACTGGTAAACTGATTTTT**GGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAAGatattcagaaccc
tgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacia
agtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagca
acaaatctgactttgcatgtgcaaacgcctcaacaacagcattattcagaagacaccttctcccagcccagaaagttcctgtgatgtca
agctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaacttcaaaacctgtcagtgattgggtccgaatcctcctcctgaaagtggcc
25 gggtttaatctgctcatgacgctgcggctgtggtccagc

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVVQEGEDFTTYCNS**STLSNI**QWYKQRPGG
HPVFLIQ**LVKSGEV**KKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYF**CAGLGSSNTGKLIF**GQGTTL

QVKPDiqnppavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvtyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipe
dtffpspesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrillkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

5 TRBV2/ TRBJ2-7/TRBC1

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCG
AGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTG
10 CGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAA
GTGGAATTCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGAC
CAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAATT
GAGGACTCCGCTATGTATTTTTGCGCAACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTTGGG
CCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGaggacctaacaaggtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaa
15 gcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttctccctgaccacgtggagctgagctggtgggtgaat
gggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatactgcctgag
cagccgcctgagggtctcggccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatga
cgagtggaccagatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcggtg
tcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatccttatgagatcctgtagggaaggccaccctgtatgctgtgctggtcagcgcccttggtg
20 ttgatggccatggtcaagagaaaggatttc

Secuencia de proteína de la cadena beta

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCATTGRASYEQYFGPGT
25 RLTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqplkeqpalsryclssrlrvsatf
wqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgftsvsyqqgvlstilyeillgkatlyavlvsalvImamvkrkdf

Secuencia de E7-11-455 de tipo salvaje

Cadena alfa:

TRAV12-3/TRAJ37/TRAC

Secuencia de ADN de la cadena alfa

5 Atgatgaagtcctgcgggtgctgctcgatgtttgtggctgcagctgtctgggtctgggtcccagcaaaaagaggtggaacagg
accctggacctctgtctgtgctgaaggcgccattgtgtccctgaactgtacctacagcaacagcgcttcagttactttatgtggtacagg
cagtacagccggaagggccctgagctgctgatgtacacatacagcagcggaacaaagaggacggcagattcacagcccaggtgg
acaagtccagcaagtacatctccctgttcatccgggacagccagcctagcgatagcgccacctacctgtgtGCCATGGCTGGCT
CAGGGAATACTGGCAAGCTCATCTTCGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAG
10 atatccagaaccctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgatttgattctcaaac
aaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgt
gtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattatccagaagacaccttctccccagcccagaaa
gttcctgtgatgtcaagctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaacctgtcagtgattgggtccgaatcctcc
tctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgtgcggctgtggtccagc

15

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAIIVSLNCTYSNSAFQYFMWYR
QYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMAGSGNTGKLIF
GQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvjyitdkvldmrsmdfksnsavawnsksdfacan
20 afnnsiipedtffpesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrilllkvagnllmtrlwss

Cadena beta:

TRBV7-9/TRBJ2-4/TRBC1

25

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCC
GATACGGGAGTGTCCCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGGGGCCAGAACGTGACCTT
CCGCTGTGACCCTATCAGCGAGCACAACCGGCTGTATTGGTACAGACAGACACTCGGCCAGG
GGCCTGAATTTCTCACATACTTTCCAGAACGAAGCCCAGCTGGAAAAGTCCCGGCTGCTGAGC

GATAGATTTTCCGCCGAGAGGCCCAAGGGCTCCTTCAGCACTCTGGAAATTCAGCGCACCGA
 GCAGGGCGACTCTGCCATGTATCTGTTGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAAATATTCAGTATTTT
 GCGGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGaggacctaacaaggtgtcccacccgaggtcgtgtgttgagccatc
 agaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttctccctgaccacgtggagctgagctggtggg
 5 tgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatactgcc
 tgagcagccgcctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgga
 atgacgagtggaaccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctc
 ggtgtcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggaaggccaccctgtatgctgtgctggtcagcgccc
 ttgtgttgatggccatggtcaagagaaaggatttc

10

Secuencia de proteína de la cadena beta

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLG
 QGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSSSTKNIQYFG
 AGTRLSVLEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstpqplkeqpalsryclssrlr
 15 vsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlstilyeillgkatlyavlvsalvmamvkr
 kdf

Secuencia de codones optimizados de E7-11-28 MGTM (que también se conoce como
 20 "TCR28" o "28" o "TCR-200-A02". En algunas formas de realización, las secuencias de ADN de
 codones optimizados de la cadena alfa y la cadena beta que codifican el TCR se pueden utilizar
 como se muestra en un vector que se provee en la Tabla 3, por ejemplo el vector pNVVD160.)

Cadena alfa:

25 TRAV25/TRAJ37/MGTM, TRAC modificado

Secuencia de ADN de la cadena alfa

ATGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCC
 AGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTAC

TGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACC
 CTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTC
 CAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGT
 GGGCACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAG
 5 GGACAACTTTACAAGTAAACAGacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcg
 acaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagac
 cgtgtctggacatgctggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctgggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgccttc
 aacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtccttcgagacag
 acaccaatctgaacttcagaacctgctgggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggc
 10 tgtggagc

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSTLSNIQWYKQRPGG
 HPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGIGSSNTGKLIFGQGTTL
 15 QVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyyitdkvldmrsmdfksnsavawsnkdsdfacanafnnsiipe
 dtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnlvivlrillkvagfnllmtrlws

Cadena beta:

TRBV2/TRBJ2-7/MGTM, TRBC modificado

20

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCG
 AGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTG
 CGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAA
 25 GTGGAATTCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGAC
 CAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACAAACTT
 GAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTGCGGTTTCATATGAGCAATATTTCGGGC
 CGGGCACCAGGCTCACGGTCACAgagatctgaacaaggtgttcctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggcc
 gagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggc

aaagagggtgactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctcca
 gactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccagggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgag
 tggaccagagacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgctcc
 tatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgct
 5 gatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaagggtccgggagcgggt

Secuencia de proteína de la cadena beta

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
 VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTR
 10 LTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstppqlkeqpalndsryclssrlvsatfw
 qnprnhfrcqvfqfgyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqqvlsatilyeillgkatlyavlvsalvImamvkrkdfgsg
 rakrsgsg

Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el
 15 sitio "Furina-P2A" codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas
 en un solo casete)

ATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCGAGCC
 TGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTG
 20 CGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGA
 ATCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAGTT
 CTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAACCTTGAGG
 ACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTCGCGTTTCATATGAGCAATATTCGGGCCGGG
 CACCAGGCTCACGGTCACAgagatctgaacaagggtgtccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatc
 25 gccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaaga
 ggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactg
 agagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccagggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggac
 ccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgctctctatca
 ccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatg

gccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggtGCGACAAACTTTAGCCTGTTG
AAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTTATGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGT
GCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGC
ACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATC
5 CAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGG
CGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGC
CTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGCACCTACTTCTTGCGCTGGCATCGGTAG
CAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAACCAGacatccaga
accccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtcagcgcagaagagcggtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaa
10 cgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagcg
ccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagc
gacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgctgctgcgg
attctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

15 Secuencia de proteína completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en
el sitio "Furina-P2A" permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete")

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTR
LTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstppqlkeqpalsrlyclssrlvsatfw
20 qnprnhfrcqvfqyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhqqvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdfgsg
rakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVEGEDFTTY
CNSSTTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTDDVGTYF
CAGIGSSNTGKLIFGQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvvyitdktvldmrsmdfk
snsavawnsksdfacanafnnsiipedtffpsdvpdcvklveksfetdtnlnfqnlvivlrillkvagfnllmtlrlws

25

**Secuencia de codones optimizados de E7-11-176 MGTM (que también se conoce
como "TCR176" o "176")**

Cadena alfa:

TRAV29DV5/TRAJ41/MGTM, TRAC modificado

Secuencia de ADN de la cadena alfa

Atggccatgctgctgggagccagcgtgctgattcttggctccagcctgactgggtcaacagccagcagaagaacgacgatca
 gcaagtgaagcagaacagccccagcctgagcgtgcaagaaggcagaatctccatcctgaactgcgactacaccaactctatgttcga
 5 ctacttcctgtgtgtacaagaagtaccccgccgagggacccaccttctgatcagcatcagctccatcaaggacaagaacgaggacgg
 ccggttcaccgtgttctgaacaagagcgccaagcacctgagcctgcacatcgtgccttctcagcctggggattccgccgtgtattttgCG
CCGCAAAAAATTCAAATTCAGGTTATGCCCTCAACTTTGGCAAAGGCACCTCGCTGTTGGTCA
 CACCCCatatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggac
 ttgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgctggagcatggac
 10 ttcaagagcaacagcgccgtggcctgggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggaca
 ccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgct
 ggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

Secuencia de proteína de la cadena alfa

15 MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFL
 WYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKNSNSGYA
LNFGKGTSLLVTPHqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqksdsvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfa
 canafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdnlnfqnlvivlrlillkvagfnllmtlrlws

20 Cadena beta:

TRBV24-1/TRBJ2-6/MGTM, TRBC modificado

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGG
 25 ACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACCGGCAAGCGGATCATGCTG
 GAATGCAGCCAGACCAAGGGCCACGACCGGATGTACTGGTACAGACAGGATCCAGGACTGG
 GCCTGCAGCTGATCTACTACAGCTTCGACGTGAAGGACATCAACAAGGGCGAGATCAGCGAC
 GGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAAGCGCTATCCC
 CAACCAGACTGCCCTGTACTTCTTGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCCGGCGCCAACGTTCTTA

CCTTTGGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGCTGgaagatctgaacaaggtgttcctccagaggtggccgtgttcg
 agccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttg
 gtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtg
 ctgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgag
 5 cgagaacgacgagtggaaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggc
 atcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaaggccaccctgtacgccgtgctg
 gtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcgggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggt

Secuencia de proteína de la cadena beta

10 MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQT**KGHDR**MYWYRQDPG
 LGLQLIYY**SFDVKD**INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYF**CATSDRSSGANVLTF**GA
 GSRLTVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstdpqplkeqpalndsryclssrlvs
 atfwqnprnhfrqcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdf
 gsgrakrsgsg

15

Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el
 sitio "Furina-P2A" codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas
 en un solo casete)

20 ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGG
 ACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACCGGCAAGCGGATCATGCTG
 GAATGCAGCCAGACC**AAGGGCCACGACCGG**ATGTACTGGTACAGACAGGATCCAGGACTGG
 GCCTGCAGCTGATCTACTAC**AGCTTCGACGTGAAGGAC**ATCAACAAGGGCGAGATCAGCGAC
 GGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCCGAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAAGCGCTATCCC
 25 CAACCAGACTGCCCTGTACTTCT**TGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCCGGCGCCAACGTTCTTA**
CCTTTGGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGCTGgaagatctgaacaaggtgttcctccagaggtggccgtgttcg
 agccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttg
 gtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtg
 ctgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgag

cgagaacgacgagtggaacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggc
 atcaccagcgcctcctatcaccagggcggtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaaggccaccctgtacgccgtgctg
 gtgtctgtctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggtGCGACAA
ACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGGCCATGCTG
 5 CTGGGAGCCAGCGTGCTGATTCTTTGGCTCCAGCCTGACTGGGTCAACAGCCAGCAGAAGAA
 CGACGATCAGCAAGTGAAGCAGAACAGCCCCAGCCTGAGCGTGCAAGAAGGCAGAATCTCCA
 TCCTGAACTGCGACTACACCAACTCTATGTTGACTACTTCCTGTGGTACAAGAAGTACCCCG
 CCGAGGGACCCACCTTTCTGATCAGCATCAGCTCCATCAAGGACAAGAACGAGGACGGCCG
 GTTCACCGTGTTTCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACATCGTGCCTTCTCAGC
 10 CTGGGGATTCCGCCGTGTATTTCTTGCGCCGCAAAAAATTCAAATTCAGGTTATGCCCTCAACT
TTGGCAAAGGCACCTCGCTGTTGGTCACACCCCacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggg
 ctccaagtccagcgacaagagcggtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctac
 ataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgct
 gcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaa
 15 gtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgct
 gatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteína completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el sitio "Furina-P2A" permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete")

20 MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
 LGLQLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCATSDRSSGANVLTEGA
 GSRLTVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevshgsvstdpqpplkeqpalndsryclsslrvs
 atfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlvsalvImamvkrkdf
 gsgrakrsgsATNFSLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSL
 25 SVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSSIKDKNEDGRFTVFLNKSALHLSLHIVP
 SQPGDSAVYFCAAKNSNSGYALNFGKGTSLLVTPHiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvy
 itdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpsdvpdcklveksfetdnlnfqnlvivlrlillkvagfnllmtlrlws

Secuencia de codones optimizados de E7-11-194 MGMT (que también se conoce como “TCR194” o “194”)

Cadena alfa:

TRAV25/TRAJ37/MGMT, TRAC modificado

5

Secuencia de ADN de la cadena alfa

Atgctgctgatcacctccatgctggtgctgtggatgcagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctcagtac
cagcacgtgcaagaaggcgaggacttcaccacactactgcaacagcagcaccacactgagcaacatccagtgggtacaagcagcggc
ctggcggacaccctgtgttctgatccagctggtcaagtccggcgaagtgaagaagcagaagcggctgacctccagttcggcgaggc
10 caagaagaacagcagcctgcacatcacgccacacagaccacagatgtgggcacctacttcTGCGCTGGGCTCGGTTCC
TCTAATACTGGTAACTGATTTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAGacatccagaacc
ccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgcacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtg
agtcaaagcaaggacagcgcagctctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgcctg
ggcctggtccaacaagagcgcacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctcccagcagcgac
15 gtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattct
gctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSTLSNIQWYKQRPGG
20 HPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGLGSSNTGKLIFGQGTTL
QVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyyitdktvldmrsmdfksnsavawsnkdsfacanafnnsiipe
dtffpsdvpcdvklveksfetdtnlnfqnlvivlrvllkvagfnllmtrllws

Cadena beta:

25 TRBV2/ TRBJ2-7/MGMT, TRBC modificado

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCG
AGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTG

CGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAA
GTGGAATTCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGAC
CAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAATT
GAGGACTCCGCTATGTATTTTTGCGCAACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTTGGG
5 CCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAgaatctgaacaaggtgtccctccagaggtggcgtgttcgagccttctaagg
ccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttcccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacg
gcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctc
cagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacg
agtggaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcct
10 cctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtctgggcaagggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggt
gctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggt

Secuencia de proteína de la cadena beta

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
15 VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCATTGRASYEQYFGPGT
RLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstdpqplkeqpalsryclssrlvsatf
wqnprnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlvsalvImamvkrkdfgs
grakrsgsg

20 Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el sitio "Furina-P2A" codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete)

25 ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCG
AGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTG
CGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAA
GTGGAATTCCTGGTGTCCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGAC
CAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAACCT
GAGGACTCCGCTATGTATTTTTGCGCAACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTTGGG

CCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAgagatctgaacaaggtgttcctccagaggtggccgtgttcgagccttctaagg
 ccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacg
 gcaaagaggtgactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctc
 cagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagtttacggcctgagcgagaacgacg
 5 agtggaccagagacagagccaagccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgct
 cctatcaccagggcggtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgtctggt
 gctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggtGCGACAAACTTTAGCC
TGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGCTGCTGATCACCTCCATG
 CTGGTGCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTA
 10 CCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACACTGAGC
AACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAA
GTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAAC
 AGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGCACCTACTTCTTGCGCTGGGCT
CGGTTCTCTAATACTGGTAACTGATTTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAACCAGac
 15 atccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagcca
 gaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagca
 acagcgccgtggcctgggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctcccc
 agcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgtg
 ctgcggtattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

20

Secuencia de proteína completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el sitio "Furina-P2A" permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete)

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQK
 VEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCATTGRASYEQYFGPGT
 25 RLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqplkeqpalndsryclssrlvsatf
 wqnprnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhgqvlstilyeillgkatlyavlvsalvImamvkrkdfgs
 grakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTT
 YCNSSTTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTY
 FCAGLGSSNTGKLIFGQGTTTLQVKPDIqnpdpavyqlrdsksdksvcldfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsm

fknsavawnsksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnInfqnllvivlrllllkvagfnllmtlrlws

Secuencia de codones optimizados de E7-11-455 MGMT (que también se conoce como

5 “TCR455” o “455”)

Cadena alfa:

TRAV12-3/TRAJ37/ MGMT, TRAC modificado

Secuencia de ADN de la cadena alfa

10 Atgatgaagtcctgcgggtgctgctcgatgtttgtggctgcagctgtcttgggtctgggtcccagcaaaaagaggtggaacagg
accctggacctctgtctgtgcctgaaggcgccattgtgtccctgaactgtacctacagc[aacagcgccctccagttac](#)tttatgtggtacagg
cagtacagccggaagggccctgagctgctgatgtac[acatacagcagcggaac](#)aaagaggacggcagattcacagcccaggtgg
acaagtccagcaagtacatctccctgttcatccgggacagccagcctagcgatagcgccacctacctgtgt[GCCATGGCTGGCT](#)
[CAGGGAATACTGGCAAGCTCATCTTC](#)GGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAGacatccag
15 aaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcggtgtgtctgtttacggacttcgacagccagacca
acgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagc
gccgtggcctggccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgcctcaacaacagcatcatccccgaggacacctctccccagcag
cgacgtgccctgcgacgtgaaactggaggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggatgctgctgcg
gattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

20

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAIIVSLNCTYS[NSAFOY](#)FMWYR
QYSRKGPPELLMY[TYSSGN](#)KEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSPDSATYL[CAMAGSGNTGKLIF](#)
GQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfacan
25 afnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnInfqnllvivlrllllkvagfnllmtlrlws

Cadena beta:

TRBV7-9/TRBJ2-4/MGMT, TRBC modificado

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCC
 GATACGGGAGTGTCCCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGGGGCCAGAACGTGACCTT
 CCGCTGTGACCCTATCAGCGAGCACAAACCGGCTGTATTGGTACAGACAGACACTCGGCCAGG
 5 GGCCTGAATTTCTCACATACTTTCCAGAACGAAGCCCAGCTGGAAAAGTCCCGGCTGCTGAGC
 GATAGATTTTCCGCCGAGAGGCCCAAGGGCTCCTTCAGCACTCTGGAAATTCAGCGCACCGA
 GCAGGGCGACTCTGCCATGTATCTGTTGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAAATATTCAGTATTTT
 GGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaagatctgaacaaggtgtccctccagaggtggccgtgttcgagccttct
 aaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtc
 10 aacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagccggtactgcctg
 agctccagactgagagtgctccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagtttacggcctgagcgagaa
 cgacgagtggaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcacca
 gcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgc
 tctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaagggtccgggagcggt

15

Secuencia de proteína de la cadena beta

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISSEHNRLLYWYRQTLG
 QGPEFLTYFONEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSSSTKNIQYFG
 AGTRLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstpqplkeqpalsryclssrlr
 20 vsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlvsalvmamvkr
 kdfgsgrakrsgsg

Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en el
 sitio "Furina-P2A" codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas
 25 en un solo casete)

ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCC
 GATACGGGAGTGTCCCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGGGGCCAGAACGTGACCTT
 CCGCTGTGACCCTATCAGCGAGCACAAACCGGCTGTATTGGTACAGACAGACACTCGGCCAGG

GGCCTGAATTTCTCACATACTTCCAGAACGAAGCCCAGCTGGAAGTCCCGGCTGCTGAGC
 GATAGATTTTCCGCCGAGAGGCCCAAGGGCTCCTTCAGCACTCTGGAAATTCAGCGCACCGA
 GCAGGGCGACTCTGCCATGTATCTGTGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAATATTCAGTATTTT
 GCGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaagatctgaacaaggtgtccctccagaggtggccgtgttcgagccttct
 5 aaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtc
 aacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctg
 agctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagtttacggcctgagcgagaa
 cgacgagtggaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcacca
 gcgcctcctatcaccagggcgtgtgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgtgggaaggccaccctgtacgccgtgtgtgtctgc
 10 tctgtgtctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggtGCGACAAACTTTA
GCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGATGAAGTCCCTGCGG
 GTGCTGCTCGTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGTCTGGTCCCAGCAAAAAGAGGTGGA
 ACAGGACCCTGGACCTCTGTCTGTGCCTGAAGGCGCCATTGTGTCCCTGAACTGTACCTACA
 GCAACAGCGCCTTCCAGTACTTTATGTGGTACAGGCAGTACAGCCGGAAGGGCCCTGAGCTG
 15 CTGATGTACACATACAGCAGCGGCAACAAAGAGGACGGCAGATTCACAGCCCAGGTGGACAA
 GTCCAGCAAGTACATCTCCCTGTTTCATCCGGGACAGCCAGCCTAGCGATAGCGCCACCTACCT
GTGTGCCATGGCTGGCTCAGGGAATACTGGCAAGCTCATCTTCGGGCAAGGGACAACTTTAC
 AAGTAAACCAAGacatccagaacccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgt
 ttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgtgtggacatgcgga
 20 gcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctgttccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccc
 cgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttca
 gaacctgtgtgtgatcgtgtcgcggattctgtgtgaaagtggccggcttcaatctgtgatgacctgcggctgtggagc

25 Secuencia de proteína completa del ORF Beta y Alfa (La región en cursivas subrayada en
 el sitio "Furina-P2A" permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete)

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLG
 QGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSSSTKNIQYFG
 AGTRLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqplkeqpaindsryclssrlr
 vsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhgvlisatilyeillgkatlyavlvsalvImamvkr

kdfgsgrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSV
 PEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRD
 SQPSDSATYLCAMAGSGNTGKLIFGQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvy
 itdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtlnlfqnllvivlriillkvagfnllmtlrws

5

Tabla 2

Secuencia TCR Kite (que también se conoce como “comparador”):

10

Cadena alfa:

TRAV1-2/TRAJ7/constante alfa de ratón de codones optimizados

Secuencia de ADN de la cadena alfa

ATGTGGGGTGTCTTCCTTTTGTACGTCAGCATGAAGATGGGAGGCACTACTGGGCAAA
 15 ACATAGATCAGCCTACCGAAATGACTGCTACCGAGGGAGCCATTGTCCAAATCAACTGCACCTA
 TCAGACTAGCGGCTTCAATGGACTCTTCTGGTACCAACAGCATGCGGGCGAAGCACCTACCT
 TCTTGTCTTATAATGTCTTGGATGGTCTCGAAGAGAAAGGCAGATTCTCCAGTTTCCTCAGCC
 GGAGCAAGGGATACTCATATCTTCTCCTGAAAGAGCTTCAGATGAAGGATTCTGCATCCTATCT
CTGTGCTTCAGTCGATGGCAATAACCGACTCGCCTTTGGAAAAGGGAATCAAGTGGTCGTCAT
 20 ACCGaatattcagaaccccggaaccagccgtatatcagttgaaggaccaagatctcaggatagtagactctgtttgttacggactttgac
 tcacaaatcaacgtcccgaagactatggaaagtgttacgttcacagataagtgcgttctggacatgaaggctatggactcaaagagc
 aacggggcaattgcttggccaaccagacaagctttacgttcaggacattttaaggagactaatgctacttatccctccagcgacgttccg
 tgtgatgcgactcttaccgagaagtctttgagaccgatatgaatctcaactccagaatctgctggtgatcgttctgcggatcctgcttgaag
 gttgcaggattcaatcttcttatgactctccggctctggtcttca

25

Secuencia de proteína de la cadena alfa

MWGVFLLYVSMKMGGTTGQNIDQPTTEMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGEA
 PTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSGYSYLLLKELQMKDSASYLCASVDGNNRLAFGKGNQVV
 VIPNiqnpavayqlkdprsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfitdkcvldmkamdsksngaiawsnqtsftcqdfketnatypssdv

pcdatlteksfetdmnlfnqnlvmvrlrllllkvagfnllmtrlwss

Cadena beta:

TRBV5-6/TRBJ2-1/constante beta de ratón de codones optimizados

5

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGCCCCGGGGCTTTTGTGTTGGGCCTTGCTTTGTTTGCTTGGGGCAGGCTTGGTG
 GATGCTGGAGTCACACAGTCACCCACACACCTCATTAAAACCAGGGGACAACAAGTCACTCTG
 CGCTGCAGTCCTAAGTTCAGGCCATGACACAGTTTCCTGGTATCAACAGGCTCTGGGGCAGGG
 10 CCCTCAGTTCATTTTCCAATATTACGAGGAAGAGGAACGCCAACGCGGTAATTTCCCCGATCG
 GTTCTCTGGGCACCAAGTTCCCAAACACTACTCAAGTGAGTTGAACGTAAATGCTCTCCTCCTCGG
 AGACTCCGCCCTCTACTTGTGTGCCAGTTCTCTTGGTTGGCGGGGCGGCCGATACAATGAAC
AATTTTTTGGACCTGGTACTCGGCTGACCGTGCTAGaggacctgcgcaacgtcacccaccaaaggcagttgt
 ttgagccatcaaaggcggagatcgccaacaaacagaaagctacgctcgtgtgttggctcggggcttctcccagaccacgtagaacttct
 15 ctggtgggtcaatggaaaggaggtcattccggagtggtgactgatcccaagcgtacaaggaatccaactatagctactgtctctcatctc
 ggctccgggtgagtgcgacattctggcataatcctcggaaccacttctgatgccaagtcagttcatgggttgagcgaggaagacaagtg
 gcccgagggcagtcctaaaccagtcactcaaaacataagcgccgagcatggggtagagccgattgtgggattactagcgctcatacc
 aacaaggggtattgagcgctacaattctttacgaaattctcctcggaaggcgacgctctacgccgtactgggtgtctactctcgtggttatggc
 aatggtgaaacggaaaaacagc

20

Secuencia de proteína de la cadena beta

MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSQYQQALG
 QGPQFIFQYYEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLGDSALYLCASSLGWRGGRYNE
QFFGPGTRLTVLEdlrinvtpkvslfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsqvctdpqaykesnysyclsr
 25 lrvsatfwhnprnhfrcvqfhlseedkwpegsppkvtqnisaawgradcgitsasyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvstlvvmamv
 krkns

Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa

ATGGCCCCGGGGCTTTTGTGTTGGGCCTTGCTTTGTTTGCTTGGGGCAGGCTTGGTG

GATGCTGGAGTCACACAGTCACCCACACACCTCATTAACCAGGGGACAACAAGTCACTCTG
 CGCTGCAGTCCTAAGTTCAGGCCATGACACAGTTTCCTGGTATCAACAGGCTCTGGGGCAGGG
 CCCTCAGTTCATTTTCCAATATTACGAGGAAGAGGAACGCCAACGCGGTAATTTCCCGATCG
 GTTCTCTGGGCACCAGTTCCCAAACACTCAAGTGAGTTGAACGTAAATGCTCTCCTCCTCGG
 5 AGACTCCGCCCTCTACTTGTGTGCCAGTTCTCTTGGTTGGCGGGGCGGCCGATACAATGAAC
AATTTTTTGGACCTGGTACTCGGCTGACCGTGCTAGaggacctgcgcaacgtcacccaccaaaggtcagttgt
 ttgagccatcaaaggcggagatcgccaacaaacagaaagctacgctcgtgtgttggctcggggcttctccagaccacgtagaacttc
 ctggtgggtcaatggaaggaggtcattccggagtgctgactgatcccaagcgtacaaggaatccaactatagctactgtctctcatctc
 ggctccgggtgagtgcgacattctggcataatcctcggaaccacttcgatgccaagtcagttcatgggtgagcgaggaagacaagtg
 10 gcccgagggcagtcctaaaccagtcactcaaaacataagcggcaggcatgggtagagccgattgtgggattactagcgctcatacc
 aacaaggggtattgagcgctacaattctttacgaaattctcctcggaaggcgacgctctacgccgactgggtgtactctcgtggttatggc
 aatggtgaaacggaaaaacagcAGAGCCAAAAGAAGTGGTTCTGGCGCGACGAATTTAGTTTGCTTAA
 GCAAGCCGGAGATGTGGAGGAAAATCCTGGACCGATGTGGGGTGTCTTCCTTTTGACGTCA
 GCATGAAGATGGGAGGCACTACTGGGCAAACATAGATCAGCCTACCGAAATGACTGCTACCG
 15 AGGGAGCCATTGTCCAAATCAACTGCACCTATCAGACTAGCGGCTTCAATGGACTCTTCTGGT
 ACCAACAGCATGCGGGCGAAGCACCTACCTTCTTGTCTATAATGTCTTGGATGGTCTCGAAG
 AGAAAGGCAGATTCTCCAGTTTCTCAGCCGGAGCAAGGGATACTCATATCTTCTCCTGAAAG
 AGCTTCAGATGAAGGATTCTGCATCCTATCTCTGTGCTTCAGTCGATGGCAATAACCGACTCG
CCTTTGGAAAAGGGAATCAAGTGGTCGTCATACCGaatattcagaacccgaaccagccgtatatcagttgaagg
 20 acccaagatctcaggatagtagactctgtttgtttacggactttgactcaciaatcaacgtcccgaagactatggaaagtggtagttcatca
 cagataagtgcgttctggacatgaaggctatggactcaaagagcaacggggcaattgctgggtccaaccagacaagctttacctgtcagg
 acattttaaggagactaatgtacttatccctccagcgacgttccgtgtgatgcgacttaccgagaagtctttgagaccgatatgaatctc
 aactccagaatctgctggtgatcgttctcggtatcctgcttgaaggtgcaggattcaatcttctatgactctccggctctggtcttca

25 Secuencia de proteína completa del ORF Beta y Alfa

MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSQYQQALG
 QGPQFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSLGWRGGRYNE
QFFGPGTRLTVLEdlrinvtpkvsfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsqgvdtpqaykesnysyclssr
 lrvsatfwhnprnhfrcqvqfhglseedkwpegsppkvtqnisaewgradcgitsasyqqgvlstilyeillgkatlyavlvstlvvmamv

krknsRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMWGVFLLYVSMKMGTTGQNIDQPTMTATEGAI
 VQINCTYQ**TSGFNGL**FWYQQHAGEAPTFLSY**NVLDGLE**EEKGRFSSFLSRSKGYSYLLKELQMKD
 SASYL**CASVDGNNRLAF**GKGNQVVVIPNiqnpepavyqlkdpqsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfitdkcvldmka
 mdsksngaiawsnqtsftcqdfketnatypssdvpcdatlteksfetdmnlnfqnlvmvrlrllllkvagfnllmtlrlwss

5

* Las secuencias completas representativas que se proveen en la Tabla 1 agrupadas de acuerdo con la presentación del serotipo de MHC y subagrupadas de acuerdo con los diferentes péptidos presentados por el serotipo de MHC y a las que se unen los TCR de los subgrupos. Se describen y reivindican los TCR individuales, como aquellos que se dan como ejemplo de manera representativa en las tablas, así como el género de proteínas de unión que se unen a una secuencia de epitopes peptídicos según se describe en la presente, ya sea solos o en un complejo con un MHC, como los agrupados en las tablas que se proveen aquí. Además, se proveen genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR según se describe en la presente, y genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR según se describe en la presente. Las secuencias para cada TCR que se describen en la presente se proveen como pares de cadena alfa y cadena betas afines para cada TCR nominado. Las secuencias de TCR que se describen en la presente tienen anotaciones. Las secuencias de dominios variables están en mayúsculas. Las secuencias de dominio constante están en minúsculas. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican usando texto en negrita y subrayado. CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en el orden estándar de aparición de izquierda (extremo N) a derecha (extremo C). Los genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR según se describe en la presente, y los genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR según se describe en la presente, se indican de acuerdo con la nomenclatura IMGT bien conocida según se describe en la presente. De manera similar, las CDR1 y CDR2 de TRAV y TRBV son bien conocidas en la materia dado que se basan en secuencias de TRAV y TRBV bien conocidas y anotadas (por ejemplo, anotadas en bases de datos como IMGT disponible en imt.org e IEDB disponible en iedb.org).

Tabla 3

Vector: pTSLV102-MSCV-E7-11-28-MGTM-Q-CD8-opt

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctactcctgattagca
 gaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaag
 aggccaataaaggagagagaacaccagctgttacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtga
 ggtttgacagccgcctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaagg
 5 actttccgctggggactttccagggaggcggtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttt
 gcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgctaagcctcaataaagcttg
 ccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagc
 agtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacg
 gcaagaggcgaggggaggcgactgggtgagtacgcaaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgt
 10 cagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaattaaaacatata
 gtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagct
 acaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagata
 aaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggccgctg
 atcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagta
 15 gcaccaccaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttcttgggttcttgggagca
 gcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaattt
 gctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaa
 gatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagta
 ataaatctctggaacagatttgaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactcctaatt
 20 gaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttgtggaattggttaacataac
 aaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaaatagagtta
 ggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggccgaaggaatagaagaagaagggtg
 gagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgccgaattaattcacaaatggcagttatcatccaca
 attttaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaat
 25 taaaaaacaattacaaaaattcaaaatttccgggttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGGTGAAAGA
 CCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATA
 ACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAAC
 AGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGAT
 GCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACC

TGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTC
 TGCTCCCtGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTtGGtGgGCCAGTCCTCtGATAGACT
 GtGTCCcCtGGaTACCCGTAcggtaccgctagcgccaccATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCT
 TTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTG
 5 ACTCAGATGGGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATT
 GGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGGAATTCCTGGTGTCTTCTACAACAATGAGATCT
 CCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTC
 ACACTGAAGATCCGGTCTACCAAACCTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTC
 GCGTTTCATATGAGCAATATTTCTGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAGATCTGAACA
 10 AGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCCACACACAA
 AAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTG
 GGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAG
 CCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTG
 GCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACG
 15 AGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAG
 AGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGT
 ACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATG
 GCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGA
 CAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGACCTATGCTGCTGA
 20 TCACCTCCATGCTGGTGCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAG
 ATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGCAC
 CAACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCC
 AGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGC
 CAAGAAGAAGCAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGCACCTACTTCT
 25 GCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAA
 GTAAAACCAGACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACTCCAAGTCCAG
 CGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGTCAAAGCAAGG
 ACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCA
 ACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAG

CATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGTGCCCTGCGACGTGAAACTGGTGG
 AGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTCAGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGCGGA
 TTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGG
 GCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGA
 5 AGAAAACCCTGGCCCCATGGCGCTGCCCCGTCACCGCGCTGCTGCTGCCCCCTGGCGCTGCTG
 TTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCCACCCAGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGT
 GTCGGGAGGCGGCGGATCGTCCCAGTTCAGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTG
 GGCGAGACCGTGAGAGCTGAAATGTCAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTT
 GGCTGTTCCAGCCGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTCTGCTTTACCTGAGCCAGAAC
 10 AAGCCCAAGGCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGAC
 ACATTCGTGCTTACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTGCGCG
 CTGAGCAATTCCATCATGTATTTAGCCACTTTGTGCCAGTGTTCTGCTGCCAAGCCTACCA
 CAACACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCCTG
 AGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGCCTCGACTTT
 15 GCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTGCTGTCATT
 GGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTGCCACGGCCTG
 TGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGCGCTAAGCGCAGCGG
 TTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGGAGGAGAATCCAGGGC
 CCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTGTCTTGATGGCAACTCCG
 20 TTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAACAAGATGGTGATGCTGTCATGCG
 AGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCTACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAG
 CGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGATTCTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGG
 AGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCGCGACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACC
 AGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTACTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGAC
 25 CTTGCGCAAAGGCACCCAGCTGTCCGTGGTGGACTTCCTGCCCACCACAGCCCAGCCAACC
 AAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCC
 CTCTGTGCTCCCCCATCACCTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCT
 CTGGGTGTCGCCATCCACCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTGAGGTTTATGAAACA
 GTTTTACAAGTGATAAatcgatagatcctaataaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctc

ctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttccatttctcctcctgtataaatcctggtgctgtct
 ctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttctgacgcaacccccactggtggggcattgccacc
 acctgtcagctccttccgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttcccgtgctggacagggg
 ctgggctgtgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgcttcttggctgctcgctgtgttggcacctggattctgcgcg
 5 ggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttctcccggcgctgctgcccgtctgcccgtcttccgcgtcttcgc
 cttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggcgctccccgctgagatccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatctta
 gccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggt
 agaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgt
 gtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttat
 10 tattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggcccggttaattaaggaaagggctagatcattctgaagacg
 aaagggcctcgtgatacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcg
 gaaccctattgtttatttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaagga
 agagtatgagtattcaacattccgtgtcgccttattcccttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaa
 aagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggccgaaga
 15 acgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgcgggcaagagcaactcggtcgccgcata
 cactattctcagaatgacttggttgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtctgc
 cataacctgagtgataacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatggg
 ggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaa
 tggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagt
 20 tgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgca
 gcactggggccagatggtgaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagat
 cgctgagataggcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattttaattta
 aaaggatctagggaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaa
 agatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttgttgcg
 25 gatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggc
 caccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtctta
 ccgggttggtactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgcg
 aacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatc
 cggtgaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgaggagcttccaggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggttctgc

cacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtcctg
 gccttttgctggccttttgctcacatgttcttctgcgttatccCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGT
 GAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
 GGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCA
 5 AGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTA
 TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCA
 CGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCA
 CTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG
 CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTTACAAATAAAGCATTTTTT
 10 TTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTG
 GATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACCTCCACCCCATAACCTATTACCACTGCCAATT
 ACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGTAT
 TTGTTAAATATGTACTACAAACTtagtagt

15 **Vector: pHAGE-MSCV-E7-11-28-P2A-dnTGFbRII**

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagca
 gaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaag
 aggccataaaggagagagaacaccagctgttacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtgga
 ggtttgacagccgcctagcatttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggg
 20 actttccgctggggactttccagggagggcgtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttt
 gcctgtactgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttg
 ccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagc
 agtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacg
 gcaagaggcgagggggcggcgactggtagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgt
 25 cagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaattaaaacatata
 gtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagct
 acaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagata
 aaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcgggccggccgtg
 atcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagta

gcaccaccaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgggaataggagcttgttcttgggttcttgggagca
 gcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatt
 gctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaa
 gatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcattgaccactgctgtgccttggatgctagtggagta
 5 ataatctctggaacagatttgaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactcctaatt
 gaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttgtggaattggtttaacataac
 aaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtaatagagtta
 ggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgagggaatagaagaagaagggtg
 gagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgccgaattaattcacaaatggcagtattcatccaca
 10 attttaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaat
 taaaaaacaattacaaaaattcaaaatttcgggtttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGGTGAAAGA
 CCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATA
 ACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAAC
 AGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGAT
 15 GCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACC
 TGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTC
 TGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTtGGtGgGCCAGTCCTCtGATAGACT
 GtGTCCcCtGGaTACCCGTAcggtaccgctagcgccaccatggatacctggctcgtgtgttgggccatcttagcctgctgaagg
 ccggactgaccgagcctgaagtgaccagactccaagccatcaagtgactcagatggggcaagaagtcattctgcgttgcgtgcccatc
 20 agcaaccacctgtacttttattggtatcgccagatcctgggcccagaaagtggaattcctggtgtccttctacaacaatgagatctccgagaag
 tccgagatcttcgacgaccagttctccgtggaaagacccgacggcagcaacttcacactgaagatccggtctaccaaactgaggactcc
 gctatgtattttgtgcAATCACAGGTGCGGTTTCATATGAGCAATATTTGCGGCCGGGCACCAGGCTCA
 CGGTCACAGAAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTAAG
 GCCGAGATCGCCCACACACAAAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTTCCCCGA
 25 CCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATC
 CCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTG
 AGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTTA
 CGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTG
 TCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGT

GCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGG
 TGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAA
 AGGTCCGGGAGCGGTGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACaagccggCGACGTTGAAGAGAACC
 CCGGACCTatgctgctgatcacctccatgctggtgctgtggatgcagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctc
 5 agtaccagcacgtgcaagaaggcgaggacttcaccacctactgcaacagcagcaccacactgagcaacatccagtgggtacaagcag
 cggcctggcgacacccctgtgttctgatccagctggtcaagtccggcgaagtgaagaagcagaagcggctgaccttcagttcggcga
 ggccaagaagaacagcagcctgcacatcaccgccacacagaccacagatgtgggcacctacttcTGCGCTGGCATCGGTA
 GCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAGacatccag
 aaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgcacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagacca
 10 acgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagc
 gccgtggcctgggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcag
 cgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttcagaacctgctggatcgtgctgcg
 gattctgctgCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGG
 CTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAA
 15 GAAAACCCTGGCCCCATGGGTCTGGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCC
 TGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGAGTCGGTTAATAACGACATG
 ATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGAG
 ATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTG
 AGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGA
 20 GACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCC
 AAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTCTGTAGCT
 CTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGT
 TGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTG
 TCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTaaccggcagcagaagTAGTGATAAatcgatagatcctaataac
 25 ctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgct
 attgcttcccgatggcttcatcttctccttgataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtg
 tgtgactgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttccccctccctattg
 ccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgctggacaggggctcggtgttgggactgacaattccgtgggtgtgtcggggaa
 atcatcgtccttcttggtgctgcgctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgga

ccttcctccccgpgcctgctgccggctctgpgcctcttcgpgcttcgpcctcagacgagtcggatctccctttgggcccgcctccc
 cgctgagatccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaatt
 cactcccaacgaagacaagatctgcttttgcttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggga
 acccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgctcaagtagtgtgtgccgctctgtgtgactctggttaactagagatccctcaga
 5 ccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtg
 agaggccccgggtaattaaggaaagggctagatcattctgaagacgaaagggcctcgtgatacgctattttataggtaatgtcatgata
 ataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgpggaacccctattgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgct
 catgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcggtgcgpccttattccctttttgc
 ggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcga
 10 actggtatcacaagcpggtaagatcctgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcg
 gtattatcccgtgttgacgccccgaagagcaactcggctcgccgatacactattctcagaatgacttggttgagtactaccagtcacaga
 aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtataaactgcggccaacttactctgaca
 acgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaat
 gaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactactta
 15 ctctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggttt
 attgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgpggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtagttatc
 tacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtca
 gaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaa
 atcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgpgtaatctgct
 20 gcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcpggtggtttgtttgccpgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagc
 agagcgcagataccaaatactgttcttagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctg
 ctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcg
 gtcgggctgaacggggggtctgtcacacagcccagctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatga
 gaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcpggacaggtatccggttaagcpggaggggtcgaacaggagagcgcacgagggga
 25 gcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgpcacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggc
 ggagcctatggaaaaacgcagcaacgcpgccttttacgggtcctggccttttgctggccttttgctcacatgttcttctcgttatccCCT
 GATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG
 ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTC
 TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCAAGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTATG

CAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGC AAAAAGCTCCCCGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTAT

5 GACATGATTACGAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACTTCCCACCCCATACCCTATTACCACTGCCAATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGTATTTGTAAATATGTACTACAAACTtagtagt

10 Vector: pNVVD154_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR

GAATTCGTCGACGCTAGCTGGCTTGTTGTCCACAACCATTAAACCTTAAAAGCTTTAAAA GCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTATA TTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATG

15 AGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTCATTAAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACAT GAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCTGTACAGTAGAATTGGTAAAGAG AGTTGTGTAAAATATTGAGTTCGCACATCTTGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTG ATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCAATTA CATTGCTTGCAATTAACCCTTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAGAAAGATTTGGTTTTCG

20 GATTTGTGTTACATAAGATGCCTAAAATAAAAATTGAGATTCAATTTTTTTTAACTTTTTTTTAATT GGTGGTAAGAATATTCCCTCTACCTGTTTGAGAGTAATGAAATTGTAGTATGATTTTTCAACAAAC TAAAAAACAACATAAATCTCACATAATAACTTTATTTCAATCACACAATTGAATACCAATAGGTTG ACAGTACTTACCAGCCTGCAGGT**GAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGT**

AACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTT

25 **AGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCC** **CCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGC** **GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAAC** **TAACCAATCAGTTTGCTTCTTGCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGA** **GCCCACAACCCCTCACTTGGTGGGCCAGTCCTCTGATAGACTGTGTCCCTGGATACCCGTA**

CGGTACCGCTAGCGCCACCATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGA
 AGGCCGGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGG
 GGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCC
 AGATCCTGGGCCAGAAAGTGGAATTCCTGGTGTCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAG
 5 TCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGA
 AGATCCGGTCTACCAAACCTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTGCGGTTT
 CATATGAGCAATATTTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAGATCTGAACAAGGT
 GTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCCACACACAAAAA
 GCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGG
 10 TCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGC
 CTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTG
 GCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGA
 CGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGG
 AAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATC
 15 CTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGC
 TGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCG
 GTGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCT ATG
CTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGTCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAG
TGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAA
 20 CAGCAGCACCACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGT
GTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAG
TTCCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTG
GGCACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAG
GGACAACCTTTACAAGTAAAACCAGACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAG
 25 GGACTCCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAAC
GTGAGTCAAAGCAAGGACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGA
GCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCG
CCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGTGCC
CTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTCAGAAC

CTGCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGAC
CCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTG
 CTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGTCACCGCGC
 TGCTGCTGCCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCCACCCAGGGCAC
 5 ATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCGGGAGGCGGCGGATCGTCCCAGTTCAGAGTGTCCC
 CTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGGAGCTGAAATGTCAGGTCCTGCTGAG
 CAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGCCGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACG
 TTCCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATT
 CTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCGTGCTTACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACG
 10 AGGGCTACTATTTCTGTTTCGGCGCTGAGCAATTCCATCATGTATTTAGCCACTTTGTGCCAGT
 GTTCTGCCTGCCAAGCCTACCACAACACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCA
 TCGCGAGTCAACCGTTGAGCCTGAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCCGCTGCGGGGGGTGCCGT
 CCACACCAGGGGCCTCGACTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCT
 GCGGGGTGCTGCTGCTGCTGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGG
 15 GTCTGTAAGTGCCACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTA
 CGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGT
 GATGTGGAGGAGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCT
CACTGTCTTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAA
CAAGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCTAC
 20 GACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGATTCTGCT
AAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCGCGACGCATC
CCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTACTTCTGTATGAT
CGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCCGTGGTGGACTTCCTG
CCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCC
 25 GCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCACCTTGGACTGCTGGTGGCGGG
AGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTGCGCCATCCACCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCG
CCCGCCTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTGATAAATCGATGGAAGGGTGGCATCCCTGT
 GACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGT
 CCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAG

GGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTAT
 TGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGT
 TCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCT
 CAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAAC
 5 TCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCA
 CTGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGC
 ACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGA
 GAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAG
 GGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT
 10 GCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTA
 TGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT
 TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGT
 GCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTC
 GCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGAC
 15 GCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTT
 TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGG
 GGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCT
 CTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCG
 TCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAA
 20 AATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGG
 CCTTTCGTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCAC
 CTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCG
 ATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAA
 TTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG
 25 TTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAACTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTCTGCAGAT
 ATCACGGCTAGCGCCACCATGGGTGCGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCG
 TCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGTTCGGTGAATAACGAC
 ATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACGTGTGTAAATTTTGTGATGTGA
 GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGA

GAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGAC
 AGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAG
 TGCATTATGAAGGAGAAGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATG
 AGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTC
 5 ATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCA
 TCTTCTACTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGGTTCAGGCGCAACGAATTTCT
 CTTTGCTGAAGCAGGCTGGGGATGTCGAAGAAAATCCGGGTCCAATGGTGGGCTCGCTCAAC
 TGCATCGTAGCAGTCTCCCAGAATATGGGCATCGGGAAGAACGGTGATTTCCCGTGGCCCCCA
 CTTGCAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATGACTACAACCTCCTCCGTGGAGGGTAAGCAG
 10 AACCTGGTCATCATGGGGAAGAAGACCTGGTTCTCTATCCCTGAAAAAACC GCCCCCTGAAG
 GGCCGCATCAACCTGGTGCTGAGCAGGGAACCTCAAGGAGCCTCCTCAGGGCGCGCATTTTCT
 GAGCCGCTCATTGGATGACGCTCTCAAAGTACCGAACAGCCGGAGCTAGCCAACAAGGTGG
 ACATGGTGTGGATCGTCGGAGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCCGGCCAC
 TTGAAGCTGTTTCGTCACCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACACGTTCTTTCCAGAGATT
 15 GACCTGGAGAAGTACAAGCTGCTGCCCCGAGTACCCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGA
 GAAAGGCATCAAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAA
 TGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAAT
 AGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC
 ATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTCTTATATCTATGA
 20 AAAACATTCAAAGCACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTCACTACTCTATTGCAAAGATAT
 GTACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGCTAGTTTTTCAAATTCACCTCAAGACTTTGAAAAA
 AAATTGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAATGTTACGTTAATGTTGTCA
 GGTCGAAAAATAAAATTGCAAATAGAAATTTTGTTCCTTTTTTATTGGTTTTTATTGGTGGGAAAA
 ATATTCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGGTAGAGTCGACAAGCTT

25

Mapa del vector pNVVD154_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-
 DHFR



Clave: CD: agrupación de diferenciación; RNA-OUT: ARN antisentido contra la levansacarasa bacteriana codificado por sacB. SV: virus de simio TCR: receptor de células T, TIR: repetición terminal invertida, QBend: Anticuerpo CD34 de ratón anti humano, dnTGFbRII: Receptor II de TGF-beta dominante negativo, DHFR: marcador de selección de dihidrofolato reductasa

Vector: pNVVD160_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR

GAATTCGTCGACGCTAGCTGGCTTGTTGTCCACAACCATTAAACCTTAAAAGCTTTAAAA
GCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTATA

TTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATG
 AGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTCATTAAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACAT
 GAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCTGTACAGTAGAATTGGTAAAGAG
 AGTTGTGTAAATATTGAGTTCGCACATCTTGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTG
 5 ATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACCTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCAATTA
 CATTGCTTGCAATTAACCCTTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAGAAAGATTTGGTTTTCG
 GATTTGTGTTACATAAGATGCCTAAATAAAAATTGAGATTCAATTTTTTTTAACTTTTTTTTAATT
 GGTGGTAAGAATATTCCCTCTACCTGTTTGAGAGTAATGAAATTGTAGTATGATTTTTCAACAAAC
 TAAAAAACAACATAAATCTCACATAATAACTTTATTTCAATCACACAATTGAATACCAATAGGTTG
 10 ACAGTACTTACCAGCCTGCAGGT**GAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGT**
AACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTT
AGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCC
CCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGC
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAAC
 15 **TAACCAATCAGTTTGCTTCTTGCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGA**
GCCCACAACCCCTCACTTGGTGGGCCAGTCCTCTGATAGACTGTGTCCCTGGATACCCGTA
CGGTACCGCTAGCGCCACCATGGATACCTGGCTCGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGA
AGGCCGGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGG
GGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCC
 20 **AGATCCTGGGCCAGAAAGTGGAATTCCTGGTGTCTTCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAG**
TCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGA
AGATCCGGTCTACCAAACCTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTGCGGTTT
CATATGAGCAATATTTGCGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAGATCTCAATAAAGTG
TTCCCCCCTGAGGTTGCGGTGTTTGAGCCGTCAAAGCGGAGATTGCCACACACAGAAAG
 25 **CGACTTTGGTTTGTTTGGCGACAGGCTTTTTCCCTGACCACGTAGAGCTGTCTTGGTGGGTC**
AACGGCAAGGAGGTTTACAGCGGTGTGTCAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCT
GCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGC
AGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACG
AGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAA

GAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCT
 GTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTG
 ATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGT
 GCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGCT
 5 GCTGATCACCTCCATGCTGGTGCTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTG
ATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAACA
GCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGTGT
TTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTT
CGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGG
 10 CACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGG
ACAACTTTACAAGTAAAACCAGACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGG
ACTCCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGT
GAGTCAAAGCAAGGACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCC
 15 AACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGTGCCCT
GCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTCAGAACCT
GCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCC
TGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTGCT
 GAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGTCACCGCGCTG
 20 CTGCTGCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCCACCCAGGGCACATT
CTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCGGGAGGCGGCGGATCGTCCCAGTTCAGAGTGTCCCCTC
 TGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGGAGCTGAAATGTCAGGTCTGCTGAGCAA
 CCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGCCGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTC
 CTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTC
 25 CGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCTGTGCTTACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGG
 GCTACTATTTCTGTTTCGGCGCTGAGCAATTCCATCATGTATTTAGCCACTTTGTGCCAGTGTTT
 CTGCCTGCCAAGCCTACCACAACACCAGCTCCCCGTCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGC
 GAGTCAACCGTTGAGCCTGAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCAC
 ACCAGGGGGCCTCGACTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGG

GGTGCTGCTGCTGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCT
GTAAGTGCCACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTG
CGCGCTAAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGT
GGAGGAGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTG
5 TCTTGCAATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAACAAGA
TGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCTACGACA
GCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGATTCTGCTAAAG
GCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCGCGACGCATCCCGC
TTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTACTTCTGTATGATCGTT
10 GGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCCGTGGTGGACTTCCTGCCCA
CCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCCGCCCT
GAAACCCAGAAGGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCACCTTGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCT
GGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTCGCCATCCACCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCGC
CTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTGATAAATCGATGGAAGGGTGGCATCCCTGTGACCCC
15 TCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATA
AAATTAAGTTGCATCATTTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGT
GGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAAC
CAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCG
ATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAA
20 TTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAAT
CTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTC
CCTTCCCTGTCCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCG
CCCACAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGT
GGCGCGGGGTAAACTGGGAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG
25 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCC
AGAACACAGGTAAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCC
TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTT
GGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAG
TTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG

TCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTT
 TCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGC
 CGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGC
 GAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCC
 5 TGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACC
 AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGG
 ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGT
 CCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAG
 TTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT
 10 CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTG
 GAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTT
 TTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGAACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCACGGC
 TAGCGCCACCATGGGTTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGG
 ACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTGAATAACGACATGATAGTC
 15 ACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCA
 CCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCAC
 AGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCC
 ATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTAT
 GAAGGAGAAGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCCTGTAGCTCTGATGAGTGCAA
 20 TGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTC
 AAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTA
 CTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGGTTCAGGCGCAACGAATTTCTCTTTGC
 TGAAGCAGGCTGGGGATGTGCAAGAAAATCCGGGTCCAATGGTGGGCTCGCTCAACTGCATC
 GTAGCAGTCTCCCAGAATATGGGCATCGGGAAGAACGGTGATTTCCCGTGGCCCCCACTTCG
 25 CAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATGACTACAACCTCCTCCGTGGAGGGTAAGCAGAACCT
 GGTTCATCATGGGGAAGAAGACCTGGTTCTCTATCCCTGAAAAAACC GCCCCCTGAAGGGCC
 GCATCAACCTGGTGCTGAGCAGGGAACCTCAAGGAGCCTCCTCAGGGCGCGCATTTTCTGAGC
 CGCTCATTGGATGACGCTCTCAAACCTGACCGAACAGCCGGAGCTAGCCAACAAGGTGGACAT
 GGTGTGGATCGTCGGAGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCCGGCCACTTGA

AGCTGTTTCGTCACCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACACGTTCTTTCCAGAGATTGACC
 TGGAGAAGTACAAGCTGCTGCCCCGAGTACCCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAA
 GGCATCAAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCT
 GGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA
 5 TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCA
 ATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTCTTATATCTATGAAAAA
 ACATTCAAAGCACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTCCCACTCTATTGCAAAGATATGTAC
 CGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGCTAGTTTTTCAAATTCACCTCAAGACTTTGAAAAAAAT
 TGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAATGTTACGTTAATGTTGTCAGGTC
 10 GAAAAATAAAATTGCAAATAGAAATTTTGTTCCTTTTTTATTGGTTTTTATTGGTGGGAAAAATATT
 CCCTCTAACTGCAAAGGGTTAATTATGTTAGAGGTAGAGTCGACAAGCTT

Mapa del vector pNVVD160_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-
 DHFR



Clave: CD: agrupación de diferenciación; RNA-OUT: ARN antisentido contra la levansacarasa bacteriana codificado por sacB. SV: virus de simio TCR: receptor de células T, TIR: repetición terminal invertida, QBend: Anticuerpo CD34 de ratón anti humano, dnTGFbRII: Receptor II de TGF-beta dominante negativo, DHFR: marcador de selección de dihidrofolato reductasa

* Para los vectores de la Tabla 3, las notas son las siguientes: el promotor MSCV está resaltado en negritas. La cadena beta está anotada usando texto resaltado en negritas y cursiva. La cadena alfa está anotada usando texto resaltado en negritas. La marca Q está anotada usando texto en cursiva y subrayado. CD8-alfa está en cursiva. CD8-beta está subrayado.

* En las Tablas 1-3 de la presente se incluyen epitopes peptídicos, así como moléculas de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más de identidad en toda su longitud completa con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO que se mencionan en las Tablas 1-4, o una porción de las mismas. Dichos polipéptidos pueden tener la función del polipéptido o péptido de longitud completa, como se describirá adicionalmente en la presente.

10

* Las Tablas 1-3 incluyen moléculas de ácido nucleico de ARN (por ejemplo, con timinas reemplazadas por uridinas), moléculas de ácido nucleico que codifican ortólogos de las proteínas codificadas, así como secuencias de ácidos nucleicos de ADN o ARN que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más de identidad en toda su longitud completa con la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias que se mencionan en las Tablas 1-4, o una porción de las mismas. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden presentar la función del ácido nucleico de longitud completa como se describirá adicionalmente en la presente.

20

En algunas formas de realización, las proteínas de unión divulgadas en la presente pueden comprender un receptor de célula T (TCR), un fragmento de unión a antígeno de un TCR o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas formas de realización, la proteína de unión divulgada en la presente puede comprender dos cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una CDR3 de una cadena alfa de un TCR y una CDR3 de una cadena beta de un TCR o una CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena alfa y de una cadena beta de un TCR. En algunas formas de realización, una proteína de unión comprende un TCR de cadena simple (TCRcs), que comprende ambos dominios TCR V α y TCR V β , pero solo un dominio constante solamente de un TCR (C α o C β). El término “receptor de antígeno quimérico”

25

(CAR) se refiere a una proteína de fusión modificada para contener dos o más secuencias de aminoácidos naturales unidas entre sí de una manera no natural o que no es natural en una célula huésped, donde dicha proteína de fusión puede funcionar como un receptor cuando está presente sobre la superficie de una célula. Los CAR incluidos en la presente invención pueden comprender una porción extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno (es decir, obtenida o derivada de una inmunoglobulina o una molécula tipo inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o un TCR, o un dominio de unión a antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor asesino de una célula NK) unido a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (que opcionalmente contiene uno o más dominios coestimulantes) (véase, por ejemplo, Sadelain y col., (2013) *Cancer Discov.*; 3: 388, Harris y Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 220, y Stone y col., (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 1163).

En algunas formas de realización, 1) la CDR de la cadena alfa de un TCR, el dominio V_α de un TCR y/o una cadena alfa de un TCR están codificados por un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC que se mencionan en la Tabla 1, y/o 2) la CDR de la cadena beta de un TCR, el dominio V_β de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están codificados por un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se mencionan en las Tablas 1, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas, en comparación con la secuencia de CDR de referencia cognada que se menciona en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión (por ejemplo, el TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR o un receptor de antígeno quimérico (CAR)) divulgadas en la presente son quiméricas (por ejemplo, comprenden residuos o motivos de aminoácidos de más de un donante o especie), humanizadas (por ejemplo, comprenden residuos de un organismo no humano alteradas o sustituidas a fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad en un ser humano) o humanas.

Los métodos para producir proteínas de unión modificadas, tales como TCR, CAR, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son bien conocidas en la materia (por ejemplo, Bowerman y col., (2009) *Mol. Immunol.* 5: 3000, Patente de los EEUU N°: 6.410.319, Patente de

los EEUU N°: 7.446.191, publicación de Patente de los EEUU N°: 2010/065818; Patente de los EEUU N°: 8.822.647, publicación PCT N° WO 2014/031687, Patente de los EEUU N°: 7.514.537, y Brentjens y col., (2007) *Clin. Cancer Res.*, 73: 5426).

En algunas formas de realización, la proteína de unión descrita en la presente es un TCR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es expresada sobre una superficie celular, en donde el TCR expresado sobre la superficie celular se puede asociar de manera más eficiente con una proteína CD3 en comparación con un TCR endógeno. Cuando una proteína de unión incluida en la presente invención, tal como un TCR, es expresada sobre la superficie de una célula tal como una célula T, también puede presentar una mayor expresión sobre la superficie de la célula en comparación con una proteína de unión endógena, tal como un TCR endógeno. En algunas formas de realización, en la presente se provee un CAR, en donde el dominio de unión del CAR comprende un dominio de unión del TCR específico del antígeno (véase, por ejemplo, Walseng y col., (2017) *Scientific Reports* 7: 10713).

También se proveen proteínas de unión modificadas (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de TCR, o CAR) que se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos usando una proteína de unión que tiene una o más de las secuencias V_α y/o V_β que se divulgan en la presente como material de partida para manipular una proteína de unión modificada que puede presentar propiedades alteradas con respecto a la proteína de unión de partida. La proteína de unión se puede manipular mediante modificación de uno o más residuos en una o ambas regiones variables (es decir, V_α y/o V_β), por ejemplo en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones de marco. Además, o como alternativa, la proteína de unión se puede manipular mediante modificación de residuos en las región(es) constante(s).

Otro tipo de modificación de la región variable comprende mutar residuos de aminoácidos en las regiones V_α y/o V_β CDR1, CDR2 y/o CDR3 para así mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) de la proteína de unión de interés. Se puede realizar una mutagénesis dirigida al sitio o una mutagénesis mediada por PCR para introducir una o más mutaciones y el efecto sobre la unión de la proteína, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *ex vivo*, o *in vivo* que se describen en la presente y se proveen en los Ejemplos. En algunas formas de realización, se pueden introducir modificaciones conservadoras

(como se describió antes). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. En algunas formas de realización, las mutaciones son sustituciones. Además, típicamente no se modifica más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos en una región de CDR.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de TCR, o CAR) que se describen en la presente pueden comprender una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos con relación a un TCR natural. En algunas formas de realización, cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas en comparación con la secuencia de CDR de referencia cognada que se menciona en la Tabla 1. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son bien conocidas y pueden ser naturales o se pueden introducir cuando la proteína de unión se produce de manera recombinante. Las sustituciones, supresiones y adiciones de aminoácidos se pueden introducir en una proteína usando métodos de mutagénesis conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY). Se pueden emplear procedimientos de mutagénesis específicos del sitio, dirigida a oligonucleótidos (o específica de segmentos) para proveer un polinucleótido alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, supresión o inserción deseada. Como alternativa, se pueden usar técnicas de mutagénesis aleatoria o de saturación, tal como mutagénesis por barrido de alanina, mutagénesis con una reacción en cadena de polimerasa sujeta a error, y mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para preparar variantes de polipéptidos inmunogénicas (véase, por ejemplo, Sambrook y col., supra).

Hay una variedad de criterios conocidos por el experto para indicar si un aminoácido que está sustituido en una posición particular en un péptido o polipéptido es conservador (o similar). Por ejemplo, una sustitución por un aminoácido similar o un aminoácido conservador es aquella en donde un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Los aminoácidos similares se puede incluir en las siguientes categorías: aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina,

tirosina, cisteína, histidina); aminoácidos con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano); aminoácidos con cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano). La prolina, que es

5 considera como la más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, leucina, valina, isoleucina y alanina). En algunas formas de realización, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico pueden considerarse como una sustitución similar por cuanto la glutamina y la asparagina son

10 derivados amida del ácido glutámico y del ácido aspártico, respectivamente. Como se comprenderá en la materia, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina mediante comparación de secuencias de aminoácidos y sustitutos de aminoácidos conservados en las mismas del polipéptido con respecto a la secuencia de un segundo polipéptido (por ejemplo, usando GENEWORKS™, Align, el algoritmo BLAST u otros algoritmos que se describen en la presente y se emplean en la materia).

15 En algunas formas de realización, una proteína de unión codificada (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) puede comprender un "péptido señal" (también conocido como secuencia directriz, péptido directriz o péptido de tránsito). Los péptidos señal dirigen a los polipéptidos recién sintetizados a su ubicación apropiada dentro o fuera de la célula. El péptido señal se puede eliminar del polipéptido durante la localización o la secreción o una vez

20 completadas. Los polipéptidos que tienen un péptido señal en la presente se denominan "pre-proteínas" y los polipéptidos en los cuales se ha eliminado el péptido señal en la presente se denominan proteínas o polipéptidos "maduros". En algunas formas de realización, una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende un dominio V_{α} maduro, un dominio V_{β} maduro o ambos. En algunas formas

25 de realización, una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende una cadena β de TCR madura, una cadena α de TCR madura o ambas.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión son proteínas de fusión que comprenden: (a) un componente extracelular que comprende un TCR o fragmento de unión a

antígeno del mismo; (b) un componente intracelular que comprende un dominio efector o una porción funcional del mismo; y (c) un dominio transmembrana que une los componentes extracelular e intracelular. En algunas formas de realización, la proteína de fusión se puede unir (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que
 5 comprende un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula del MHC (por ejemplo, una molécula del MHC de clase I). En algunas formas de realización, la molécula del MHC comprende una cadena alfa del MHC que es un serotipo HLA HLA-A*02. En algunas formas de realización, el alelo HLA se selecciona entre el grupo que consiste en los alelos HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 y HLA-A*0207. En algunas formas de
 10 realización específicas, el alelo HLA es HLA-A*0201.

Como se usa en la presente, un “dominio efector” o un “dominio efector inmunológico” es una porción o dominio intracelular de una proteína de fusión o receptor que puede promover de manera directa o indirecta una respuesta inmunológica en una célula cuando recibe la señal apropiada. En algunas formas de realización, un dominio efector es de una proteína de una célula
 15 inmunológica, o una porción de la misma, o de un complejo de proteínas de una célula inmunológica que recibe una señal cuando está unido (por ejemplo, CD3ζ), o cuando la proteína de la célula inmunológica, o una porción de la misma, o un complejo de proteínas de una célula inmunológica que se une de manera directa a una molécula diana y desencadena una transducción de señales del dominio efector en una célula inmunológica.

20 Un dominio efector puede promover de manera directa una respuesta celular cuando contiene uno o más dominios o motivos de señalización, tal como un motivo de activación basado en tirosina intracelular (ITAM), tales como los que se encuentran en moléculas coestimulantes. Sin vinculación a ninguna teoría, se cree que los ITAM son de utilidad para la activación de células T después de la unión del ligando por un receptor de célula T o por una proteína de fusión que
 25 comprende un dominio efector de una célula T. En algunas formas de realización, el componente intracelular, o una porción funcional del mismo, comprende un ITAM. Algunos ejemplos de dominios efectores inmunológicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellos de CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk,

SLAMF1, SIp76, pT α , TCR α , TCR β , TRIM, Zap70, PTCH2, o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, un dominio efector comprende un dominio de señalización de un receptor de linfocitos (por ejemplo, CD3 ζ o una porción funcional o una variante del mismo).

5 En formas de realización adicionales, el componente intracelular de la proteína de fusión comprende un dominio coestimulante o una porción funcional del mismo seleccionado entre CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD2, CD5, ICAM-I (CD54), LFA-I (CD11a/CD18), ICOS (CD278), GITR, CD30, CD40, BAFF-R, HVEM, LIGHT, MKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, un ligando que se une (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a CD83, o una
10 variante funcional del mismo, o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el componente intracelular comprende un dominio coestimulante CD28 o una porción funcional o variante del mismo (que opcionalmente puede incluir una mutación LL-GG en las posiciones 186-187 de la proteína CD28 nativa (por ejemplo, Nguyen y col., (2003) *Blood* 702: 4320), un dominio coestimulante 4-1BB o una porción funcional o variante del mismo, o ambos.

15 En algunas formas de realización, un dominio efector comprende un endodominio CD3 ϵ , o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD27 o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo, o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio
20 CD28 o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo, o una variante funcional del mismo. En otras formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio 4-1BB, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio OX40, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una
25 variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD2, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD5, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende

un endodominio ICAM-I, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio LFA-I, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio ICOS, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo.

Un componente extracelular y un componente intracelular incluidos en la presente invención están unidos mediante un dominio transmembrana. Un "dominio transmembrana", como se usa en la presente, es una porción de una proteína transmembrana que se puede insertar en una membrana celular o puede abarcar una membrana celular. Los dominios transmembrana tienen una estructura tridimensional que es termodinámicamente estable en una membrana celular y en general su longitud varía en un rango entre aproximadamente 15 aminoácidos y aproximadamente 30 aminoácidos. La estructura de un dominio transmembrana puede comprender una hélice alfa, un barril beta, una lámina beta, una hélice beta o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana comprende o deriva de una proteína transmembrana conocida (por ejemplo, un dominio transmembrana CD4, un dominio transmembrana CD8, un dominio transmembrana CD27, un dominio transmembrana CD28 o cualquier combinación de los mismos).

En algunas formas de realización, el componente extracelular de la proteína de fusión comprende además un conector dispuesto entre el dominio de unión y el dominio transmembrana. Como se usa en la presente cuando se refiere a un componente de una proteína de fusión que conecta los dominios de unión y transmembrana, un "conector" puede ser una secuencia de aminoácidos que comprende entre aproximadamente dos aminoácidos y aproximadamente 500 aminoácidos, que puede proporcionar flexibilidad y espacio para el movimiento conformacional entre dos regiones, dominios, motivos, fragmentos o módulos unidos por el conector. Por ejemplo, un conector incluido en la presente invención puede ubicar el dominio de unión alejado de la superficie de una célula huésped que expresa la proteína de fusión a fin de permitir un contacto apropiado entre la célula huésped y una célula diana, unión a antígeno y activación (Patel y col., (1999) *Gene Terapia* 6: 412-419). La longitud del conector se puede variar para maximizar el

reconocimiento del antígeno en base a la molécula diana seleccionada, el epítopo de unión seleccionado o el tamaño y la afinidad del dominio de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Guest y col., (2005) *Immunother.*, 28: 203-11 y la publicación PCT N° WO 2014/031687). Algunos ejemplos de conectores incluyen aquellos que tienen una cadena de aminoácidos de glicina-serina que comprende entre aproximadamente uno y diez repeticiones de Gly_xSer_y, en donde x e y son cada uno de manera independiente un número entero entre 0 y 10, siempre que x e y no sean ambos 0 (por ejemplo, (Gly₄Ser)₂, (Gly₃Ser)₂, Gly₂Ser o una combinación de los mismos, tal como ((Gly₃Ser)₂Gly₂Ser)).

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que abarca la presente invención pueden estar unidas covalentemente a una unidad. En algunas formas de realización, la unidad unida covalentemente comprende una marca de afinidad o una etiqueta. La marca de afinidad se puede seleccionar entre el grupo que consiste en glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a calmodulina (CBP), marca de proteína C, marca Myc, marca Halo, marca HA, marca Flag, marca His, marca biotina y marca V5. La marca puede ser una proteína fluorescente. En algunas formas de realización, la unidad unida covalentemente se selecciona entre el grupo que consiste en un agente inflamatorio, un agente antiinflamatorio, una citoquina, una toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo, por ejemplo un Fv monocatenario.

Una proteína de unión se puede conjugar con un agente utilizado para la adquisición de imágenes, investigación, terapéutica, teranóstica, productos farmacéuticos, quimioterapia, terapia de quelación, administración dirigida de fármacos y radioterapia. En algunas formas de realización, una proteína de unión se puede conjugar o fusionar con agentes detectables, por ejemplo un fluoróforo, un colorante de infrarrojo cercano, un agente de contraste, una nanopartícula, una nanopartícula que contiene metal, un quelato metálico, un medio de contraste de rayos X, un agente PET, un metal, un radioisótopo, un colorante, un quelante de radionúclidos u otro material adecuado que se pueda usar en la adquisición de imágenes. En algunas formas de realización, a una proteína de unión se le pueden unir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fracciones detectables. Algunos ejemplos no limitativos de radioisótopos incluyen emisores alfa, emisores beta, emisores de positrones y emisores gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona entre el grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio,

cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212. En algunas formas de realización, los tejidos y fluidos biológicos no extinguen fácilmente los colorantes del infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el fluoróforo es un agente fluorescente que emite radiación electromagnética en una longitud de onda entre 650 nm y 4000 nm, donde dichas emisiones se utilizan para detectar dicho agente. Algunos ejemplos no limitativos de colorantes fluorescentes que se pueden usar como molécula de conjugación incluyen DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, IRDye-800, VivoTag-680, Cy5.5, ZQ800 o verde de indocianina (ICG). En algunas formas de realización, los colorantes del infrarrojo cercano frecuentemente incluyen colorantes de cianina (por ejemplo, Cy7, Cy5.5 y Cy5). Algunos ejemplos adicionales no limitativos de colorantes fluorescentes para usar como molécula de conjugación de acuerdo con la presente invención incluyen naranja o amarillo de acridina, Alexa Fluors® (por ejemplo, Alexa Fluor® 790, 750, 700, 680, 660 y 647) y cualquier derivado del mismo, 7-actinomicina D, ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico, colorante ATTO® y cualquier derivado del mismo, colorante de auramina-rodamina y cualquier derivado del mismo, bensenstrona, bimano, 9-10-bis(feniletinil)antraceno, 5,12-bis(feniletinil)antraceno, bisbenzimidaz, brainbow, calceína, carbofluoresceína y cualquier derivado de los mismos, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno y cualquier derivado del mismo, DAPI, DiOC6, DyLight® Fluors® y cualquier derivado de los mismos, epicocconona, bromuro de etidio, FIAsh-EDT2®, colorante Fluo y cualquier derivado del mismo, FluoProbe® y cualquier derivado del mismo, fluoresceína y cualquier derivado del mismo, Fura® y cualquier derivado del mismo, GelGreen® y cualquier derivado del mismo, GelRed® y cualquier derivado del mismo, proteínas fluorescentes y cualquier derivado de las mismas, isoformas de proteínas y cualquier derivado de las mismas tales como, por ejemplo, mCherry, colorante de hetametina y cualquier derivado del mismo, tinción de Hoeschst, iminocumarina, amarillo indio, indo-1 y cualquier derivado del mismo, laurdan, amarillo lucifer y cualquier derivado del mismo, luciferina y cualquier derivado de la misma, luciferasa y cualquier derivado de la misma, mercocianina y cualquier derivado de la misma, colorantes Nilo y cualquier derivado de los mismos, perileno, floxina, ficocolorante y cualquier derivado del mismo, yoduro de

propio, piranina, rodamina y cualquier derivado de la misma, ribogreen, RoGFP, rubreno, estilbeno y cualquier derivado del mismo, sulforrodamina y cualquier derivado de la misma, SYBR y cualquier derivado del mismo, sinapto-pHluorin, tetrafenil butadieno, tris tetrasódico, rojo Texas, amarillo Titan, TSQ, umbeliferona, violantrona, proteína fluorescente amarilla y YOYO-1. Otros

5 colorantes fluorescentes adecuados incluyen, pero de manera no taxativa, fluoresceína y colorantes de fluoresceína (por ejemplo, isotiocianina de fluoresceína o FITC, naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína o FAM, etc.), carbocianina, merocianina, colorantes de estirilo, colorantes de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, colorantes de rodamina (por ejemplo, carboxitetrametil-rodamina o TAMRA, carboxi-rodamina 6G, carboxi-X-

10 rodamina (ROX), lisamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina verde, rodamina roja, tetrametilrodamina (TMR), etc.), colorantes de cumarina y cumarina (por ejemplo, metoxicumarina, dialquilaminocumarina, hidroxicumarina, aminometilcumarina (AMCA), etc.), colorantes Oregon Green™ (por ejemplo, Oregon Green™ 488, 500, 514., etc.), Texas Red®, Texas Red®-X, SPECTRUM RED®, SPECTRUM GREEN®, colorantes de cianina (por ejemplo, CY-3, Cy-5, CY-

15 3,5, CY-5,5, etc.), Colorantes Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 350, 488, 532, 546, 568, 594, 633, 660, 680, etc.), colorantes BODIPY® (por ejemplo, BODIPY® FL, R6G, TMR, TR, 530/550, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650, 650/665, etc.), colorantes IRD (por ejemplo, IRD40™, IRD700™, IRD800™, etc.) y otros similares. Hay otros agentes detectables adecuados adicionales bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Publ. PCT No. PCT/US14/56177). Algunos

20 ejemplos no limitativos de radioisótopos incluyen emisores alfa, emisores beta, emisores de positrones y emisores gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona entre el grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es actinio, bismuto,

25 plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212.

Las proteínas de unión se pueden conjugar con un radiosensibilizador o un fotosensibilizador. Algunos ejemplos de radiosensibilizadores incluyen, pero de manera no taxativa: ABT-263, ABT-199, WEHI-539, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino,

gemcitabina, etanidazol, misonidazol, tirapazamina y derivados básicos de ácidos nucleicos (por ejemplo, purinas o pirimidinas halogenadas, tales como la 5-fluorodesoxiuridina). Algunos ejemplos de fotosensibilizadores incluyen, pero de manera no taxativa: moléculas fluorescentes o esferas que generan calor cuando se alumbran, nanopartículas, porfirinas y derivados de porfirinas (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas y naftalocianinas), metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, colorantes de calcogenapirrillio, clorofilas, cumarinas, flavinas y compuestos relacionados como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feoforbidas, pirofeoforbidas, cianinas (por ejemplo, merocianina 540), feofitinas, zafirinas, texafirinas, purpurinas, porficonos, fenotiazinios, derivados del azul de metileno, naftalimidas, derivados del azul del Nilo, quinonas, perilenoquinonas (por ejemplo, hipericinas, hipocrelinas y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdinas, colorantes de xanteno (por ejemplo, eosinas, eritrosinas, rosa de Bengala), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas y profármacos tales como el ácido 5-aminolevulínico. De manera ventajosa, este enfoque permite un direccionamiento muy específico hacia las células de interés (por ejemplo, células inmunitarias) utilizando tanto un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) como energía electromagnética (por ejemplo, radiación o luz) simultáneamente. En algunas formas de realización, la proteína de unión se fusiona o se une de manera covalente o no covalente al agente, por ejemplo, directamente o a través de un conector.

En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede modificar químicamente. Por ejemplo, una proteína de unión se puede mutar para modificar propiedades del péptido tales como la detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, semivida, carga superficial, el carácter hidrofóbico, los sitios de conjugación, el pH, su función y características similares. La metilación en N es un ejemplo de metilación que puede ocurrir en una proteína de unión abarcada por la presente invención. En algunas formas de realización, una proteína de unión se puede modificar por metilación en aminos libres, por ejemplo por metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwitteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una región Fc, una cadena de carbono saturada simple tal como palmitato o miristolato o albúmina. La

modificación química de una proteína de unión con una región Fc puede ser una fusión Fc-proteína. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácido con repetición de aminoácidos individuales (por ejemplo, poliglicina) y una secuencia de poliaminoácido con secuencias de poliaminoácidos mixtos que pueden o no seguir un patrón, o cualquier combinación de lo anterior.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que abarca la presente invención pueden estar modificadas. En algunas formas de realización, las [proteínas] modificadas tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa con una proteína de unión original para generar una variante funcional que conserva una o más actividades biofísicas y/o biológicas de la proteína de unión original (por ejemplo, conserva la especificidad de unión del pMHC). En algunas formas de realización, la mutación es una sustitución conservativa de aminoácidos.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que abarca la presente invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -ter-butilglicina.

Las proteínas de unión que abarca la presente invención pueden estar glicosiladas, amidadas, carboxiladas, fosforiladas, esterificadas, N-aciladas, cicladas (por ejemplo, mediante un puente disulfuro) o convertidas en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizadas o polimerizadas o conjugadas.

En algunas formas de realización, para prolongar la vida media de un péptido que abarca la presente invención se puede usar la unión de una unidad hidrofóbica, como el extremo N-

terminal, el extremo C-terminal o un aminoácido interno. En otras formas de realización, una proteína de unión puede incluir modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la vida media en suero. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con cadenas de carbono simples (por ejemplo, por mediante miristoilación y/o palmitilación). En algunas formas de realización, las cadenas de carbono simples pueden hacer que las proteínas de unión se puedan separar fácilmente del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas de unión del material no conjugado incluyen, pero de manera no taxativa, extracción con solvente y cromatografía de fase reversa. Las unidades lipofílicas pueden prolongar la vida media, mediante la unión reversible a la albúmina sérica. Las unidades conjugadas pueden ser unidades lipofílicas que prolongan la vida media de los péptidos mediante la unión reversible a la albúmina sérica. En algunas formas de realización, la unidad lipofílica puede ser colesterol o un derivado de colesterol, incluyendo a colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteroles. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado del mismo. En otras formas de realización, una proteína de unión se puede acoplar (por ejemplo, se puede conjugar) a un agente modificador de la vida media. Algunos ejemplos de agentes modificadores de la vida media incluyen, pero de manera no taxativa: un polímero, un polietilenglicol (PEG), un hidroxietilalmidón, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero zwitteriónico soluble en agua, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero soluble en agua de prolina, alanina y serina, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico o una molécula que se une a la albúmina. En algunas formas de realización, se puede acoplar un espaciador o conector a una proteína de unión, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más residuos de aminoácidos que sirven como espaciadores o conectores, para facilitar la conjugación o fusión con otra molécula, como así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con otras unidades que, por ejemplo, pueden modificar o efectuar cambios en las propiedades de las proteínas de unión.

Una proteína de unión se puede producir de manera recombinante o sintética, por ejemplo

por síntesis de péptidos en fase sólida o síntesis de péptidos en fase de solución. La síntesis de polipéptidos se puede realizar empleando métodos sintéticos conocidos, por ejemplo mediante el uso de la química de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o la química de butiloxycarbonilo (Boc). Los fragmentos de polipéptido se pueden unir entre sí de manera enzimática o sintética.

5 En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen métodos para producir una proteína de unión según se describe en la presente, que comprenden los pasos de: (i) cultivar una célula huésped transformada que ha sido transformada por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión según se describe aquí en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de
10 unión expresada.

 A manera de ejemplo, los métodos útiles para aislar y purificar la proteína de unión producida de manera recombinante pueden incluir la obtención de sobrenadantes de sistemas de células huésped/vectores adecuados que secretan la proteína de unión en medios de cultivo y luego concentrar los medios utilizando un filtro que se puede obtener comercialmente. Después de
15 la concentración, el concentrado se puede aplicar a una única matriz de purificación adecuada o a una serie de matrices adecuadas, por ejemplo un arreglo de afinidad o una resina de intercambio iónico. Para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante se pueden emplear uno o más pasos de HPLC de fase reversa. Estos métodos de purificación también se pueden emplear cuando se aísla un inmunógeno de su ambiente natural. Los métodos para la producción a gran
20 escala de una o más de las proteínas de unión según se describen en la presente incluyen el cultivo celular por lotes, que se supervisa y controla para mantener las condiciones de cultivo apropiadas. La purificación de la proteína de unión se puede realizar de acuerdo con los métodos según se describen en la presente y conocidos en la técnica.

 En cualquiera de las formas de realización que se describen en la presente, la proteína de
25 unión codificada es capaz de unirse a un complejo péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula del MHC (por ejemplo, una molécula del MHC de clase I). En algunas formas de realización, la molécula del MHC comprende una cadena alfa del MHC que es un serotipo HLA HLA-A*02. En algunas formas de realización, el alelo HLA se selecciona entre el grupo que consiste en los alelos HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-

A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 y HLA-A*0207.

Hay una variedad de ensayos que son bien conocidos para evaluar la afinidad de unión y/o para determinar si una molécula de unión se une (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un ligando particular (por ejemplo, un complejo de péptido antígeno-MHC). Es propio del nivel de un experto en la materia determinar la afinidad de unión de una proteína de unión por una diana, tal como un epítopo peptídico de células T de un polipéptido diana, tal como mediante el uso de cualquiera de numerosos de ensayos de unión que son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede usar un equipo Biacore™ para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación (K_D) del complejo se puede determinar mediante monitoreo de los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo que una solución amortiguadora pasa sobre el chip. Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tales como un ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA), o determinación de la unión mediante monitoreo del cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas por medio de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear (RMN). Otros ejemplos de ensayos incluyen, pero en un sentido no taxativo, transferencia Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore™) (véase, por ejemplo, Scatchard y col., (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660, Wilson (2002) *Science* 295: 2103, Wolff y col., (1993) *Cancer Res.*, 53: 2560, y las Patentes de los EEUU N°: 5,283,173 y 5,468,614), citometría de flujo, secuenciación y otros métodos de detección de ácidos nucleicos expresados. En un ejemplo, se mide la afinidad aparente por una diana mediante evaluación de la unión a varias concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando multímeros marcados, tal como tetrámeros de MHC-péptido antigénico. En un ejemplo representativo, K_D aparente de una proteína de unión se mide usando diluciones 2X de tetrámeros marcados en un rango de concentraciones, seguido por determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, donde K_D aparente se determina como la concentración del ligando que dio como resultado la unión media máxima.

III. Ácidos nucleicos y vectores

En un aspecto incluido en la presente invención, aquí se proveen moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de los TCR, CAR y otros similares), péptidos y fragmentos de los mismos según se describen en la presente.

5 En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico se hibridiza, en condiciones severas, con el complemento de una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad, tal como en toda la longitud completa, con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las
10 secuencias de polipéptidos que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico se hibridiza, en condiciones severas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se mencionan en la Tabla 1.

15 En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en o consiste en) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se mencionan en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que
20 codifica por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de la cadena α de un TCR que se muestra en la Tabla 1. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V α de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por
25 lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de un dominio V α de un TCR que se muestra en la Tabla 1. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de un TCR que tiene una secuencia de

aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de una cadena α de un TCR que se muestra en la Tabla 1.

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de la cadena β de un TCR que se muestra en la Tabla 1. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_β de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de un dominio V_β de un TCR que se muestra en la Tabla 1. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena β de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de una cadena β de un TCR que se muestra en la Tabla 1.

El término “ácido nucleico” incluye los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “molécula de ácido nucleico”, y en general se refieren a un polímero de ADN o ARN, que puede ser de hebra simple o de hebra doble, que se sintetizó o se obtuvo (por ejemplo, se aisló y/o purificó) a partir de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace natural, no natural o alterado entre nucleótidos, tal como un enlace fosforamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster que se encuentra entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende un ADN complementario (ADNc).

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprendidos en la presente invención son recombinantes. Tal como se usa en la presente, el término “recombinante” se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácidos nucleicos que se

pueden replicar en una célula viva, o (ii) moléculas que son el resultado de la replicación de las que se describieron antes en (i). A los efectos de la presente, la replicación puede ser replicación *in vitro/ex vivo* o replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos se pueden construir en base a una síntesis química y/o mediante reacciones de ligación enzimáticas usando procedimientos conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook y *col.*, supra. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede sintetizar químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas maneras que se diseñaron para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras una hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Algunos ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida con N⁶, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos incluidos en la presente invención se pueden obtener de compañías, tal como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

En una forma de realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de codones optimizados. Sin limitaciones a una teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficacia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede involucrar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica al mismo aminoácido, que puede ser traducido por el ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula,

aumentando así la eficacia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que podrían interferir con la traducción, aumentando de esa manera la eficacia de la traducción. En algunas formas de realización, las secuencias de nucleótidos que se describen en la presente tienen codones optimizados para su expresión en una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica, tal como una célula T).

La presente invención también provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente o una secuencia de nucleótidos que se hibridiza en condiciones severas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

La secuencia de nucleótidos que se hibridiza en condiciones severas se puede hibridizar en condiciones de gran severidad. Las “condiciones de gran severidad” significan que la secuencia de nucleótidos se hibridiza de manera específica con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que una hibridación no específica. Las condiciones de gran severidad incluyen condiciones que permitirán distinguir un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que solo contiene unas pocas faltas de coincidencia dispersas, de una secuencia aleatoria que resultara tener unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidan con la secuencia de nucleótidos. Dichas regiones de complementariedad pequeñas se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y una hibridación de gran severidad las vuelve fácilmente distinguibles. Las condiciones de severidad relativamente altas incluirán, por ejemplo, condiciones bajas en sales y/o de temperatura alta, tal como provistas por NaCl 0,02-0,1 M aproximadamente o un valor equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Dichas condiciones de gran severidad toleran pocas, si algunas, faltas de coincidencia entre la secuencia de nucleótidos y el molde o la hebra diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. Se puede apreciar en general que las condiciones se pueden volver más severas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La presente invención también provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de

nucleótidos que es por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en la presente.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” se refieren a un vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo) en una célula huésped, de modo tal de transformar al huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Por consiguiente, un objeto adicional de la presente invención se relaciona con un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, un potenciador, un terminador y semejantes, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras su administración a un sujeto. Algunos ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células de animales incluyen el promotor y potenciador tempranos de SV40 (Mizukami T. y *col.*, 1987), el promotor y potenciador LTR del virus de leucemia de ratones Moloney (Kuwana Y y *col.*, 1987), el promotor (Mason J O y *col.*, 1985) y el potenciador (Gillies S D y *col.*, 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y semejantes.

Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales. Algunos ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H y *col.*, 1990), pAGE103 (Mizukami T y *col.*, 1987), pHSG274 (Brady G y *col.*, 1984), pKCR (O'Hare K y *col.*, 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H y *col.*, 1990) y semejantes. Otros ejemplos de plásmidos representativos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos de integración, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y semejantes. Algunos ejemplos de vectores virales representativos incluyen vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales, herpes virus y AAV. Dichos virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la materia, tal como mediante células empaquetadoras de virus o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Algunos ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317,

células PsiCRIP, células positivas para GPenv, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes de replicación defectuosa son bien conocidos en la materia y se pueden consultar, por ejemplo, en la publicación PCT WO 95/14785, la publicación PCT WO 96/22378, la Patente de los EEUU N°: 5.882.877, la Patente de los EEUU N°: 6.013.516, la Patente de los EEUU N°: 4.861.719, la Patente de los EEUU N°: 5.278.056 y la publicación PCT WO 94/19478.

En algunas formas de realización, el vector de expresión es un nanoplásmido. El término “nanoplásmido” usado en la presente se refiere a una secuencia de ADN circular que tiene una secuencia bacteriana reducida que provee un plásmido más pequeño con un inserto de carga deseado. El tamaño reducido del vector está asociado con una toxicidad inducida por ADN limitada tras la transfección y potencialmente una duración más prolongada en las células, una viabilidad potencialmente mejor después de la transfección y una eficiencia de transposición potencialmente mayor. En algunas formas de realización, el nanoplásmido es un nanoplásmido libre de un marcador de resistencia a antibióticos. En algunas formas de realización, el nanoplásmido comprende un marcador de selección y/o un marcador supresor sin sentido. Debido al tamaño pequeño del esqueleto, por ejemplo, un esqueleto <500 bp, dichos nanoplásmidos maximizan el tamaño del inserto de carga deseado. El inserto de carga deseado (por ejemplo, un transgen eucariota) puede ser de cualquier tamaño que se pueda administrar dentro de las células diana, por ejemplo, de hasta 50 kb, 45 kb, 40 kb, 35 kb, 30 kb, 25 kb, 20 kb, 18 kb, 15 kb, 12 kb, 10 kb, 5,0 kb, 4,5 kb, 4,0 kb, 3,5 kb, 3,0 kb, 2,8 kb, 2,5 kb, 2,2 kb, 2 kb, 1,8 kb, 1,5 kb, 1,2 kb, 1 kb o cualquier rango intermedio inclusive, tal como 8-12 kb. También proveen una expresión elevada del transgen y reducen el silenciamiento del transgen, con una eficacia de integración ajustable de la carga asociada con una integración aleatoria de la carga en el genoma de las células modificadas.

En algunas formas de realización, el nanoplásmido puede comprender los elementos que se muestran en los vectores provistos en la Tabla 3 (por ejemplo, R6K y RNA-OUT). Por ejemplo, en algunas formas de realización, un nanoplásmido comprende un origen de replicación ColE1 o R6K bacteriano minimizado (que provee a dichos nanoplásmidos la capacidad de ser replicables en una cepa huésped bacteriana), un marcador de selección (por ejemplo, un marcador de

selección de ARN bacteriano) y una región de un gen eucariota. Un marcador de selección de ARN es un ARN no traducido expresado incluido en un vector que regula un gen diana expresado cromosómicamente para lograr la selección del vector. Este puede ser un ARNt de supresión sin sentido incluido en un plásmido que regula una diana cromosómica seleccionable suprimible sin sentido, tal como se describe en la Patente de los EEUU N°: 6.977.174 e incorporada en la presente a modo de referencia. También puede ser un ARN represor antisentido incluido en un plásmido, un gen RNA-OUT que reprime las dianas reguladas por RNA-IN, un ARNI codificado por un origen del plásmido pMB1 que reprime dianas reguladas por RNAII, un ARNI codificado por un origen pMU720 del plásmido IncB que reprime dianas reguladas por RNA II, Sok del locus ParB del plásmido RI que reprime dianas reguladas por Hok, el locus Flm de FlmB del plásmido F que reprime dianas reguladas por flmA, un ARN represor antisentido natural tales como los que se describen, por ejemplo, en Wagner y col., (2002) *Adv. Genet.*, 46: 361 y Franch y Gerdes (2000) *Current Opin. Microbiol.*, 3: 159, o un ARN represor modificado, tal como un ARN pequeño sintético como el SgrS, MicC, o los andamiajes MicF que se describen en Park y col., (2013) *Nature Biotechnology* 31: 170-174.

Algunos ejemplos de nanoplásmidos producidos por un sistema de selección RNA-OUT libre de antibióticos y los métodos para elaborar dichos nanoplásmidos se describen, por ejemplo, en la Publ. PCT N°: WO 2008153733, la Patente de los EEUU N°: 9.737.620, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2010/0303859 y la Patente de los EEUU N°: 9.109.012, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Otros ejemplos adicionales de nanoplásmidos se describen, por ejemplo, en las Solicitudes PCT N°: PCT/US2013/000259, PCT/US2013/00067 y PCT/US2013/00068, y la publicación de Patente de los EEUU N°: 2015/0275221, cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Los nanoplásmidos se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, Nature Technology Corporation, una subsidiaria de Aldevron, provee vectores de nanoplásmido que combinan un marcador de selección de ARN con un origen de replicación relacionado con R6K, ColE2 o ColE2. Estos vectores de nanoplásmidos incluyen, por ejemplo, los vectores NTC9385C, NTC9685C, NTC9385R, NTC9685R, así como modificaciones de los mismos, tal como se divulga

en la Solicitud de PCT N°: PCT/US 13/00068; los vectores NTC9385R-BE, NTC9385Ra-O1 y NTC9385Ra-O2, tal como se describe en la Patente de los EEUU N°: 10,144,935; y los vectores minicirculares replicantes NTC9385C2, NTC9385C2a, NTC9385R2, NTC9385R2a, NTC9385R2b, NTC9385Ra, NTC9385RaF y NTC9385RbF tal como se describe en la publicación de Patente 2021/0189407, cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de unión o un polipéptido que se describe en la presente o un fragmento de los mismos. En algunas formas de realización, el ácido nucleico incluye los elementos reguladores necesarios para la expresión del marco de lectura abierto. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se pueden incluir potenciadores. Estos elementos se pueden ligar operativamente a una secuencia que codifica la proteína de unión, un polipéptido o un fragmento de los mismos.

En algunas formas de realización, el vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , un receptor TGF β dominante negativo (por ejemplo, un DN-TGF β RII), un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En determinadas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β R y/o el marcador de proteínas seleccionable está ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una marca (por ejemplo, una marca de enriquecimiento en CD34). En formas de realización específicas, una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente, tal como una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un TCR α , TCR β , CD8 α , CD8 β , DN-TGF β R y/o un marcador de proteínas seleccionable, está interconectada con un sitio de entrada a ribosomas interno o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido autoescindible, tal como P2A, E2A, F2A o T2A, etc.

En algunas formas de realización, el vector de expresión provisto en la presente comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o

más idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos que se muestran en la SEQ ID NO. 27.

Algunos ejemplos de promotores incluyen, pero en un sentido no taxativo, promotores del virus 40 de simios (SV40), promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus de inmunodeficiencia de humano (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de VIH, virus de Moloney, citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus de Sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y metalotioneína humana. Algunos ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las señales de poliadenilación de SV40 y las
5
10 señales de poliadenilación de LTR.

Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ácido nucleico. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. Los potenciadores incluyen los promotores que se describen en la presente. En algunas formas de realización, los potenciadores/promotores incluyen, por ejemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y potenciadores virales tales como aquellos de CMV, RSV y EBV.
15

En algunas formas de realización, el ácido nucleico se puede incorporar operativamente en un vehículo o vector de administración como se describirá más adelante. Los vectores de administración útiles incluyen, pero en un sentido no taxativo, microcápsulas biodegradables, complejos de estimulación inmunológica (ISCOM) o liposomas, y vehículos vivos atenuados modificados genéticamente tales como virus o bacterias.
20

En algunas formas de realización, el vector es un vector viral, tal como lentivirus, retrovirus, virus de herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus vacuna, baculovirus, virus de viruela, AV-pox, vaccinia Ankara modificada (MVA) y otros virus recombinantes. Por ejemplo, se puede usar un lentivirus para infectar células T.
25

En algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante puede administrar un polinucleótido en una célula huésped apropiada, por ejemplo, una célula T o una célula presentadora de antígenos, es decir, una célula que presenta un complejo de péptido/MHC sobre su superficie celular (por ejemplo, una célula dendrítica) y carece de CD8. En algunas formas de

realización, la célula huésped es una célula inmunitaria, por ejemplo una célula del sistema inmunológico humano. Por ejemplo, la célula del sistema inmunológico puede ser una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T doble negativa CD4/CD8, una célula T gd, una célula asesina natural, una célula dendrítica o cualquier combinación de las mismas. En algunas formas de realización, en donde una célula T es el huésped, dicha célula T puede ser naïve, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o cualquier combinación de las mismas. Por ende, los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores de la transcripción específicos del tejido linfoide (TRE), tales como TRE específicos de linfocitos B, linfocitos T o células dendríticas. Los TRE específicos del tejido linfoide son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Thompson y col., (1992) *Mol. Cell. Biol.* 72: 1043, Todd y col., (1993) *J. Exp. Med.* 777: 1663, y Penix y col., (1993) *J. Exp. Med.* 775: 1483).

En algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de un TCR, una cadena β de un TCR y/o un conector peptídico. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR de longitud completa de la proteína de unión con un conector ubicado entre ellas, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta se encuentra hacia el extremo 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos codifica las cadenas alfa de un TCR y beta de un TCR de longitud completa con un conector ubicado entre ellas, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta de un TCR se encuentra hacia el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa de un TCR. En algunas formas de realización, las cadenas alfa de un TCR y/o la cadena beta de un TCR de longitud completa se reemplazan por fragmentos de las mismas.

Como también se describirá más adelante, otro aspecto incluido en la presente invención se relaciona con una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la presente invención. Una célula huésped puede incluir cualquier célula individual o cultivo celular que puede recibir un vector o la incorporación de ácidos nucleicos y/o proteínas, así como cualquier célula de la progenie. El término también abarca la

progenie de la célula huésped, ya sea si son genéticamente o fenotípicamente iguales o diferentes. Las células huésped adecuadas pueden depender del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simios, células de insectos, células de levadura y células bacterianas. Estas células pueden ser inducidas para incorporar el vector u
 5 otro material mediante el uso de un vector viral, transformación por precipitación de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección u otros métodos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^a ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory)). El término “transformación” se refiere a la introducción de un gen “foráneo” (es decir, extrínseco o extracelular), una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, de manera que
 10 la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por dicho gen o secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido “transformada.”

Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células inmunológicas modificadas (por ejemplo, células T) pueden comprender células pan T (células T tanto CD4⁺ como CD8⁺)
 15 modificadas por administración de genes mediada por transposones/transposasa para expresar una carga genética que codifica elementos tales como las cadenas alfa y beta de un receptor de células T recombinante (TCR) específicos de un antígeno diana dado presentado sobre un MHC particular (por ejemplo, HLA clase I). El vector puede expresar elementos adicionales, tales como uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en a) los correceptores CD8 α y CD8 β
 20 para permitir el compromiso de células T CD4⁺; b) una marca de epítopo QBEND/10 derivado de CD34 fusionada al extremo amino terminal de CD8 α para permitir el seguimiento de las células modificada *in vitro* e *in vivo*; c) un receptor de TGF β tipo II dominante negativo (DN-TGF β RII) para superar la supresión inmunológica mediada por tumores; y d) un marcador de selección, tal como una forma mutada de la dihidrofolato reductasa (DHFR_{dm}) para facilitar el enriquecimiento de las
 25 células modificadas durante el proceso de elaboración. Las cadenas α y β del TCR exógeno y las cadenas α y β de CD8 pueden estar codificadas por una sola molécula de ARNm bajo el control de un solo promotor, tal como un promotor del virus de células madre de murinos (MSCV). El procesamiento de postraducción en los elementos peptídicos autoescindibles, tales como los sitios P2A, pueden dar como resultado polipéptidos independientes, tal como para producir los cuatro

polipéptidos individuales correspondientes a cada elemento en el vector. De manera similar, DN-TGF β RII y DHFRdm pueden estar codificados por una sola molécula de ARNm dirigida por un solo promotor, tal como el promotor del factor de elongación 1 α (EF1 α) humano. El procesamiento de postraducción en los elementos peptídicos autoescindibles, tales como los sitios P2A, pueden
 5 dar como resultado polipéptidos independientes, correspondientes a cada elemento individual en el vector.

Los ácidos nucleicos que son abarcados por la presente invención se pueden usar para producir un polipéptido recombinante incluido en la presente invención en un sistema de expresión adecuado. El término “sistema de expresión” se refiere a una célula huésped y un vector
 10 compatibles en condiciones adecuadas, por ejemplo para la expresión de una proteína codificada por el ADN foráneo portado por el vector e introducido en la célula huésped.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células huéspedes de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de *Baculovirus*, y células huésped y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células huésped incluyen, en un sentido no taxativo, células
 15 procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Algunos ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos,
 20 células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Algunos ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las cuales un gen de dihidrofolato reductasa (de aquí en adelante referido como “gen DHFR”) es defectuoso (Urlaub G y col; 1980), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL 1662, de aquí en adelante referidas como “células
 25 YB2/0”) y semejantes. En algunas formas de realización, se usa la célula YB2/0 dado que la actividad ADCC de las proteínas de unión quiméricas o humanizadas mejora cuando se expresa en esta célula.

La presente invención también abarca métodos para producir una célula huésped recombinante que expresa proteínas de unión, péptidos y fragmentos de los mismos, de la

presente invención, donde dicho método comprende los pasos que consisten en (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector descritos precedentemente en una célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan dichas proteínas de unión, péptidos y
5 fragmentos de las mismas. Dichas células huésped recombinantes se pueden usar en el método de diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención provee ácidos nucleicos aislados que se hibridizan en condiciones de hibridación selectivas con un polinucleótido divulgado en la presente. Por consiguiente, los polinucleótidos de esta forma de realización se pueden usar para aislar, detectar
10 y/o cuantificar los ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para identificar, aislar o amplificar clones parciales o de longitud completa en una biblioteca depositada. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son secuencias genómicas o de ADNc aisladas, o complementarias de otra manera con un ADNc de una biblioteca de ácidos nucleicos humana o de mamífero. En algunas
15 formas de realización, la biblioteca de ADNc comprende por lo menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o cualquier rango entre ellos, inclusive, tal como por lo menos aproximadamente 80%-100%, de secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de ADNc se pueden normalizar para aumentar la representación de secuencias raras.
20 Típicamente, pero no de manera exclusiva, se emplean condiciones de hibridación de severidad baja o moderada con las secuencias que presentan una identidad de secuencia reducida con relación a las secuencias complementarias. Opcionalmente, se pueden emplear condiciones de severidad moderada y alta para las secuencias de mayor identidad. Las condiciones de severidad baja permiten una hibridación selectiva de secuencias que presentan aproximadamente un 70%
25 de identidad de secuencia y se pueden emplear para identificar secuencias ortólogas o parálogas. Opcionalmente, los polinucleótidos de la presente invención codificarán por lo menos una porción de una proteína de unión codificada por los polinucleótidos que se describen en la presente. Los polinucleótidos de la presente invención abarcan secuencias de ácidos nucleicos que se pueden emplear para una hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica una proteína de unión de

la presente invención (véase, por ejemplo, Ausubel, supra y Colligan, supra).

IV. Células huésped

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen células huésped que expresan las proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos del TCR de unión a antígeno, CAR o proteínas de fusión que comprenden un TCR y un dominio efector) según se describen en la presente. En algunas formas de realización, las células huésped comprenden los ácidos nucleicos o los vectores que se describen en la presente.

En algunas formas de realización, se usa un polinucleótido que codifica una proteína de unión para transformar, transfectar o transducir una célula huésped (por ejemplo, una célula T) para su uso en una terapia de transferencia adoptiva. Los avances en la secuenciación de ácidos nucleicos y en particular la secuenciación de TCR ya fueron descritos (por ejemplo, Robins y col., (2009) *Blood* 114: 4099; Robins y col., (2010) *Sci. Translat. Med.* 2: 47ra64, Robins y col., (2011) *J. Imm. Meth.*, y Warren y col., (2011) *Genome Res.*, 21: 790) y se pueden emplear en el transcurso de la práctica de las formas de realización de la presente invención. De manera similar, los métodos para transfectar o transducir células T con los ácidos nucleicos deseados son bien conocidos en la materia (por ejemplo, en la publicación de la Patente de los EEUU N°: US 2004/0087025) así como los procedimientos de transferencia adoptiva usando las células T de la especificidad de antígeno deseada (por ejemplo, Schmitt y col., (2009) *Hum. Gen.* 20: 1240, Dossett y col., (2009) *Mol. Ther.* 77: 742, Till y col., (2008) *Blood* 772: 2261, Wang y col., (2007) *Hum. Gene Ther.*, 18: 112, Kuball y col., (2007) *Blood* 709: 2331, publicación de Patente de los EEUU N°: 2011/0243972, publicación de Patente de los EEUU N°: 2011/0189141, y Leen y col., (2007) *Ann. Rev. Immunol.* 25: 243).

Se puede modificar cualquier célula inmunológica adecuada para que incluya un polinucleótido heterólogo de la presente invención, inclusive, por ejemplo, una célula T, una célula NK o una célula T-NK. En algunas formas de realización, la célula puede ser una célula primaria o una célula de una línea celular. En algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada comprende una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺ o ambas. A los efectos de la presente, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo,

una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, sangre, médula ósea, nódulo linfático, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden purificar o se pueden enriquecer las mismas. En algunas formas de realización, la célula T es una

5 célula T humana. En algunas formas de realización, la célula T es una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier etapa del desarrollo, inclusive, pero en un sentido no taxativo, un linfocito citotóxico, una célula precursora de un linfocito citotóxico, una célula progenitora de un linfocito citotóxico, células madre de linfocitos citotóxicos, células T doble positivas CD4⁺/CD8⁺, células T auxiliares CD4⁺, por ejemplo,

10 células Th1 y Th2, células T CD4⁺, células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria centrales y células T de memoria centrales efectoras), células T naïve y semejantes.

Se puede usar cualquier método apropiado para transfectar o transducir las células, por ejemplo, células T, o para administrar las secuencias de nucleótidos o las composiciones que abarcan los métodos descritos en la presente. Los métodos para administrar polinucleótidos en las células huésped incluyen, por ejemplo, el uso de polímeros catiónicos, moléculas tipo lípido y algunos productos comerciales tal como, por ejemplo, in vivo-jetPEI®. Otros métodos incluyen transducción *ex vivo*, inyección, electroporación, DEAE-dextrano, carga por sonicación,

20 transfección mediada por liposomas, transducción mediada por receptores, bombardeo de microprojectiles, transferencia mediada por transposones y semejantes. Aún otros métodos para transfectar o transducir células huésped emplean vectores, como se describe con mayor detalle en la presente.

Las células inmunológicas modificadas que se describen en la presente se pueden caracterizar funcionalmente usando metodologías para evaluar la actividad de las células T, e incluyen determinación de la unión, activación o inducción de células T y también incluyen la determinación de las respuestas de células T que son específicas del antígeno. Algunos ejemplos incluyen determinación de la proliferación de células T, la liberación de citoquinas por de células T, estimulación de células T específica del antígeno, estimulación de células T restringida por MHC,

25

actividad CTL (por ejemplo, mediante detección de la liberación de ^{51}Cr a partir de células diana precargadas), cambios en la expresión de marcadores fenotípicos de células T y otras mediciones de las funciones de las células T.

Los procedimientos para llevar a cabo estos ensayos y otros ensayos similares se pueden consultar, por ejemplo, en Lefkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998), así como *Current Protocols in Immunology*, Weir, (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds.)(1979) *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed (1998) *Science* 281: 1309, y las referencias citadas en las mismas.

En algunas formas de realización, la afinidad aparente por una proteína de unión, tal como un TCR o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede medir mediante evaluación de la unión a varias concentraciones de multímeros de MHC. La “tinción de multímeros de MHC-péptido” se refiere a un ensayo usado para detectar las células T específicas del antígeno, que, en algunas formas de realización, caracteriza un tetrámero de moléculas de MHC, cada uno de los cuales comprende un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es cognada (por ejemplo, es idéntica o está relacionada) de por lo menos un antígeno (por ejemplo, un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉), en donde el complejo se puede unir a una proteína de unión, tal como un TCR o una porción de unión a antígeno del mismo, que reconoce al antígeno conocido. Cada una de las moléculas de MHC se puede marcar con una molécula de biotina. Los MHC/péptidos biotinilados se pueden multimerizar (por ejemplo, tetramerizar) mediante la adición de estreptavidina, que puede estar marcado con fluorescencia.

El multímero se puede detectar mediante citometría de flujo por medio de la marca fluorescente. En algunas formas de realización, se usa un ensayo de multímero de pMHC para detectar o seleccionar una proteína de unión de afinidad mejorada, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En algunos ejemplos, la K_D aparente de una proteína de unión, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, se mide usando diluciones 2X de multímeros marcados en un rango de concentraciones, seguido por determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, donde la K_D aparente se determina como la concentración de ligando que dio como resultado la unión medio máxima.

Los niveles de citoquinas se pueden determinar usando los métodos que se describen en la presente, tal como ELISA, ELISPOT, tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción intracelular citoquina y citometría de flujo).

La proliferación de células inmunológicas y la expansión clonal que es el resultado de la generación o estimulación específica del antígeno de una respuesta inmunológica se puede determinar mediante aislamiento de linfocitos, tales como linfocitos en la circulación en muestras de células de sangre periférica o de células de nódulo linfáticos, estimulación de las células con el antígeno y medición de la producción de citoquinas, proliferación celular y/o viabilidad celular, tal como mediante incorporación de timidina tritiada o ensayos no radioactivos, tales como ensayos MTT y semejantes. El efecto de un inmunógeno descrito en la presente sobre el equilibrio entre una respuesta inmunológica Th1 y una respuesta inmunológica Th2 se puede examinar, por ejemplo, mediante determinación de los niveles de citoquinas Th1, tales como IFN- γ , IL-12, IL-2 y TNF-b, y citoquinas Tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

Una célula huésped de la presente invención puede comprender un solo polinucleótido que codifica una proteína de unión descrita en la presente, o la proteína de unión puede estar codificada por más de un polinucleótido. En otras palabras, los componentes o las porciones de una proteína de unión pueden estar codificados por dos o más polinucleótidos, que pueden estar contenidos en una sola molécula de ácido nucleico o pueden estar contenidos en dos o más moléculas de ácidos nucleicos.

Aún más, como se describirá también más adelante y en los ejemplos, una célula huésped comprendida por la presente invención puede codificar y/o expresar proteínas accesorias útiles además de una proteína de unión descrita en la presente, ya sea en el mismo polinucleótido o en un polinucleótido diferente como la proteína de unión o componentes de la misma. Por ejemplo, la célula huésped puede codificar y/o expresar CD8 α , CD8 β , un DN-TGF β R (por ejemplo, un DN-TGF β RII) y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es DHFR.

En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica dos o más componentes o porciones de una proteína de unión de la presente invención comprende dichas dos o más secuencias codificantes asociadas operativamente en un solo marco de lectura abierto. Dicha

disposición puede permitir ventajosamente una expresión coordinada de los productos genéticos deseados, tales como, por ejemplo, una expresión contemporánea de las cadenas alfa y beta de un TCR, de manera tal que se producen a una relación de 1:1 aproximadamente. En algunas formas de realización, dos o más productos genéticos sustituyentes de una proteína de unión de la presente invención, tal como un TCR (por ejemplo, las cadenas alfa y beta) o CAR, se expresan como moléculas separadas y se asocian después de la traducción. En formas de realización adicionales, dos o más productos genéticos sustituyentes de una proteína de unión de la presente invención se expresan como un solo péptido, donde las partes están separadas por un segmento escindible o removible. Por ejemplo, los péptidos autoescindibles que son de utilidad para la expresión de polipéptidos separables codificados por un solo polinucleótido o vector son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, un péptido del tescovirus-1 2 A porcino (P2A), un péptido del virus thosa asigna 2A (T2A), un péptido del virus de rinitis A equino (ERAV) 2A (E2A) y un péptido del virus de aftosa 2A (F2A).

En algunas formas de realización, una proteína de unión de la presente invención comprende uno o más aminoácidos de unión. Los “aminoácidos de unión” o “residuos de aminoácidos de unión” se refieren a uno o más (por ejemplo, entre 2 y aproximadamente 10) residuos de aminoácidos situados entre dos motivos, regiones o dominios adyacentes de un polipéptido, tal como entre un dominio de unión y un dominio constante adyacente o entre una cadena de un TCR y un péptido autoescindible adyacente. Los aminoácidos de unión pueden ser el resultado del diseño de una construcción que codifica una proteína de fusión (por ejemplo, los residuos de aminoácidos que resultan del uso de un sitio de una enzima de restricción durante la construcción de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión), o de la escisión, por ejemplo, de un péptido autoescindible adyacente en uno o más dominios de una proteína de unión codificada de la presente invención (por ejemplo, un péptido P2A dispuesto entre una cadena alfa de un TCR y la cadena β de un TCR, cuya autoescisión puede dejar uno o más aminoácidos de unión en la cadena alfa, la cadena β de un TCR, o en ambas).

Las células inmunológicas modificadas de la presente invención se pueden administrar como terapias, por ejemplo, para un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16

E7₁₁₋₁₉. En algunas circunstancias, puede ser deseable reducir o detener la actividad asociada con una inmunoterapia celular. Por consiguiente, en algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada de la presente invención comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de unión y una proteína accesoria, tal como una proteína interruptora de seguridad, que se puede buscar como diana usando un fármaco cognado u otro compuesto para modular selectivamente la actividad (por ejemplo, disminuir o anular) de dichas células cuando fuera deseable. Las proteínas interruptoras de seguridad usadas de esta manera incluyen, por ejemplo, un polipéptido del receptor de EGF truncado (huEGFRt) que está desprovisto de dominios de unión a ligando N-terminales extracelulares y actividad tirosina quinasa del receptor intracelular pero retiene la secuencia de aminoácidos nativa, localización de la superficie celular transmembrana tipo I y un epítopo de unión conformacionalmente intacto para un anticuerpo monoclonal anti-EGFR de grado farmacéutico, cetuximab (Erbix) receptor de tEGF (tEGFr; Wang y col., (2011) *Blood* 118: 1255-1263), un polipéptido de caspasa (por ejemplo, iCasp9; Straathof y col., (2005) *Blood* 105: 4247-4254, Di Stasi y col., (2011) *N. Engl. J. Med.* 365: 1673-1683, Zhou y Brenner (2016) *Hematol. pii: S0301-472X: 30513-30516*), RQR8 (Philip y col., (2014) *Blood* 124: 1277-1287) y una marca de la proteína c-myc humana (Kieback y col., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 623-628)

Otros componentes accesorios que son útiles para las células terapéuticas comprenden una marca o un marcador de selección (por ejemplo, una marca de enriquecimiento de CD34) que permite identificar, clasificar, aislar, enriquecer o rastrear las células. Por ejemplo, las células inmunológicas marcadas que tienen las características deseadas (por ejemplo, un TCR específico del antígeno y una proteína interruptora de seguridad) se pueden separar de las células no marcadas en una muestra y activar y expandir de manera más eficiente para su inclusión en un producto terapéutico de la pureza deseada.

Tal como se usa en la presente, el término "marcador de selección" comprende una construcción de ácidos nucleicos que confiere un cambio identificable a una célula que permite la detección y selección positiva de las células inmunológicas transducidas con un polinucleótido que comprende un marcador de selección. Por ejemplo, RQR es un marcador de selección que comprende un bucle mayor extracelular de CD20 y dos sitios de unión de CD34 mínimos. En

algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica RQR comprende un polinucleótido que codifica el epítopo mínimo de CD34 de 16 aminoácidos. En algunas formas de realización, tal como determinadas formas de realización provistas en los ejemplos en la presente, el epítopo mínimo de CD34 se incorpora en la posición amino terminal del dominio de tallo de CD8 (Q8). En

5 formas de realización adicionales, la secuencia del sitio de unión mínimo de CD34 se puede combinar con un epítopo diana para que CD20 forme un gen marcador/suicida compacto para células T (RQR8) (Philip y col., 2014). Esta construcción permite seleccionar las células inmunológicas que expresan la construcción, donde por ejemplo, el anticuerpo específico de CD34 está unido a esferas magnéticas (Miltenyi) y que utilizan el anticuerpo farmacéutico clínicamente

10 aceptado, rituximab, que permite la supresión selectiva de un transgen que expresa una célula T modificada (por ejemplo, Philip y col., (2014) *Blood* 124: 1277-1287, publicación de Patente de los EEUU N°: 2015-0093401, y publicación de Patente de los EEUU N°: 2018-0051089).

Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen varias proteínas transmembrana tipo I truncadas que normalmente no son expresadas sobre las células T: el factor de crecimiento de

15 nervios de baja afinidad truncada, CD19 truncado y CD34 truncado (por ejemplo, Di Stasi y col., (2011) *N. Engl. J. Med.* 365: 1673-1683, Mavilio y col., (1994) *Blood* 83: 1988-1997, y Fehse y col., (2000) *Mol. Ther.* 7: 448-456). Un rasgo particularmente atractivo de CD19 y CD34 es la disponibilidad del sistema de selección de disponibilidad inmediata Miltenyi CliniMACs™ que puede buscar como diana a estos marcadores para una clasificación de grado clínico. Sin

20 embargo, CD19 y CD34 son proteínas de superficie relativamente grandes que pueden poner a prueba la capacidad de empaquetamiento del vector y la eficacia de transcripción de un vector de integración. También se pueden emplear marcadores de superficie que contienen dominios de no señalización, extracelulares, o varias proteínas (por ejemplo, CD19, CD34, LNGFR, etc.). Se puede emplear cualquier marcador de selección y debería ser aceptable para buenas prácticas de

25 fabricación. En algunas formas de realización, los marcadores de selección se expresan con un polinucleótido que codifica un producto genético de interés (por ejemplo, una proteína de unión abarcada por la presente invención, tal como un TCR o CAR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo). Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen, por ejemplo, informantes tales como GFP, EGFP, β -gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En algunas formas de realización,

un marcador de selección, tal como, por ejemplo, CD34, es expresado por una célula y dicho CD34 se puede usar para seleccionar, enriquecer o aislar (por ejemplo, mediante selección inmunomagnética) las células de interés transducidas para su uso en los métodos que se describen en la presente. Tal como se usa en la presente, un marcador CD34 se distingue de un anticuerpo anti-CD34 o, por ejemplo, un scFv, TCR, u otra unidad de reconocimiento del antígeno que se une a CD34.

En algunas formas de realización, un marcador de selección comprende un polipéptido RQR, un factor de crecimiento de nervios de baja afinidad truncada (tNGFR), un CD19 truncado (tCD19), un CD34 truncado (tCD34) o cualquier combinación de los mismos.

A modo de antecedente, la inclusión de células T CD4⁺ en un producto celular para una inmunoterapia puede proveer una secreción de IL-2 inducida por el antígeno y aumentar la persistencia y función de las células T CD8⁺ citotóxicas transferidas (por ejemplo, Kennedy y col., (2008) *Immunol. Rev.* 222: 129 y Nakanishi y col., *Nature* (2009) 52: 510). En algunas formas de realización, un TCR restringido clase I en las células T CD4⁺ puede requerir la transferencia de un correceptor CD8 para mejorar la sensibilidad del TCR a los complejos de péptido HLA clase I. Los correceptores CD4 difieren en cuanto a su estructura de CD8 y no pueden sustituir eficazmente los correceptores CD8 (por ejemplo, Stone & Kranz (2013) *Front. Immunol.* 4: 244 y Cole y col., (2012) *Immunology* 737: 139). Por consiguiente, otra proteína accesoria que se puede usar en las composiciones y los métodos de la presente invención comprende un correceptor CD8 o un componente del mismo. Las células inmunológicas modificadas que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de unión abarcada por la presente invención pueden comprender además, en algunas formas de realización, un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína correceptora CD8, o un componente de una cadena beta o una cadena alfa de la misma.

Una célula huésped se puede transducir eficazmente para que contenga, y para que pueda expresar eficazmente, un solo polinucleótido que codifica la proteína de unión, la proteína interruptora de seguridad, el marcador de selección y la proteína correceptora CD8.

En una forma de realización, la célula huésped de la presente invención incluye además un ácido nucleico que codifica una molécula coestimulante, de manera tal que la célula T

modificada expresará dicha molécula coestimulante. En algunas formas de realización, el dominio coestimulante se selecciona entre CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L.

En cualquiera de las formas de realización precedentes, la célula huésped que expresa la proteína de unión descrita en la presente puede ser una célula inmunológica universal. Una “célula inmunológica universal” comprende una célula inmunológica que ha sido modificada para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican un producto polipeptídico seleccionado entre PD-I, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, una molécula HLA, una molécula TCR o cualquier combinación de las mismas. Sin limitaciones por la teoría, algunas proteínas de la célula inmunológica expresadas de manera endógena pueden disminuir la expresión de la actividad inmunológica de las células inmunológicas modificadas (por ejemplo, PD-I, LAG-3, CTLA4, TIGIT), o pueden interferir con la actividad de unión de una proteína de unión de la presente invención expresada de manera heteróloga (por ejemplo, un TCR endógeno que se une a un antígeno no HPV16 E7₁₁₋₁₉ e interfiere con la unión de la célula inmunológica modificada a una célula diana que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, tal como un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ que comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPET en el contexto de una molécula del MHC. Además, las proteínas endógenas (por ejemplo, proteínas de células inmunológicas, tal como un alelo de HLA) expresadas sobre una célula inmunológica donante pueden ser reconocidas como foráneas por un huésped alogénico, lo cual puede dar como resultado la eliminación o supresión de la célula inmunológica modificada donante por el huésped alogénico.

Por lo tanto, la disminución o eliminación de la expresión o actividad de dichos genes o proteínas endógenos puede mejorar la actividad, tolerancia o persistencia de las células inmunológicas modificadas en el entorno de un huésped autólogo o alogénico, y permite una administración universal de las células (por ejemplo, a cualquier receptor independientemente del tipo de HLA). En algunas formas de realización, las células de acuerdo con la presente invención son singénicas, lo cual significa que son genéticamente idénticas o suficientemente idénticas e inmunológicamente compatibles como para permitir un trasplante. En algunas formas de realización, una célula inmunológica universal es una célula donante (por ejemplo, alogénica) o una célula autóloga. En algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada (por

ejemplo, una célula inmunológica universal) abarcada por la presente invención comprende el noqueo de un gen cromosómico de uno o más entre un gen que codifica PD-I, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, un componente de HLA (por ejemplo, un gen que codifica una macroglobulina α 1, una macroglobulina α 2, una macroglobulina α 3, una microglobulina β 1 o una microglobulina β 2), o un
 5 componente de un TCR (por ejemplo, un gen que codifica una región variable de un TCR o una región constante de un TCR) (véase, por ejemplo, Torikai *et al.*, (2016) *Nature Sci. Rep.* 6: 21757; Torikai *y col.*, (2012) *Blood* 179: 5697; y Torikai *y col.*, (2013) *Blood* 722: 1341, que también proveen ejemplos de técnicas de edición de genes, composiciones y terapias de células adoptivas representativas que son de utilidad de acuerdo con la presente invención).

10 Tal como se usa en la presente, el término “noqueo de un gen cromosómico” se refiere a una alteración genética o a un agente inhibidor introducido en una célula huésped que previene (por ejemplo, reduce, retarda, suprime o anula) la producción, por la célula huésped, de un producto polipeptídico endógeno funcionalmente activo. Las alteraciones que dan como resultado el noqueo de un gen cromosómico pueden incluir, por ejemplo, la introducción de mutaciones sin
 15 sentido (inclusive la formación de codones de terminación prematura), mutaciones de sentido erróneo, supresión de genes y rupturas de hebras, así como la expresión heteróloga de moléculas de ácidos nucleicos inhibitoras que inhiben la expresión de genes endógenos en la célula huésped.

En algunas formas de realización, un noqueo de genes o *knock-in* de genes cromosómicos
 20 se puede efectuar mediante edición cromosómica de una célula huésped. La edición cromosómica se puede realizar usando, por ejemplo, endonucleasas. Tal como se usa en la presente, una “endonucleasa” se refiere a una enzima capaz de catalizar la escisión de un enlace fosfodiéster en una cadena de polinucleótidos. En algunas formas de realización, una endonucleasa puede escindir un gen buscado para de esa manea inactivar o “noquear” dicho gen buscado. Una
 25 endonucleasa puede ser una endonucleasa natural, recombinante, modificada genéticamente o de fusión. Las rupturas causadas por la endonucleasa en la hebra de ácido nucleico se reparan comúnmente por medio de distintos mecanismos de recombinación homóloga o de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Durante una recombinación homóloga, se puede usar una molécula de ácido nucleico donante para el “*knock-in*” de un gen donante, para el “noqueo” de un

gen diana, y opcionalmente para inactivar un gen diana por medio de un evento de *knock in* de genes o noqueo de un gen diana. La NHEJ es un proceso de reparación sujeta a error que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión, por ejemplo, una sustitución, supresión o adición de por lo menos un nucleótido. Se puede usar NHEJ para “noquear” un gen diana. Algunos ejemplos de endonucleasas incluyen nucleasas con dedo de zinc, nucleasas TALE, nucleasas CRISPR-Cas, meganucleasas y megaTAL.

Tal como se usa en la presente, una “nucleasa con dedo de zinc” (ZFN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN con dedo de zinc fusionado a un dominio de escisión de ADN no específico, tal como una endonucleasa FokI. Cada motivo de dedo de zinc de aproximadamente 30 aminoácidos se une a aproximadamente 3 pares de bases de ADN, y los aminoácidos en algunos residuos se pueden cambiar para alterar la especificidad de la secuencia del triplete (por ejemplo, Desjarlais y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2256-2260 y Wolfe y col., (1999) *J. Mol. Biol.* 255: 1917-1934). Se pueden ligar múltiples motivos de dedo de zinc en tándem a fin de crear una especificidad de unión a las secuencias de ADN deseadas, tales como regiones que tienen una longitud que varía en un rango entre aproximadamente 9 y aproximadamente 18 pares de bases. A modo de antecedente, los ZFN median la edición del genoma catalizando la formación de una ruptura de la hebra doble del ADN (DSB) específico del sitio en el genoma, y la integración dirigida de un transgen que comprende secuencias flanqueadoras homólogas del genoma en el sitio de DSB es facilitada por una reparación dirigida por homología. Como alternativa, una DSB generada por un ZFN puede dar como resultado el noqueo de un gen diana por medio de reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es una vía de reparación celular sujeta a error que da como resultado la inserción o supresión de nucleótidos en el sitio de escisión. En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, realizada usando una molécula ZFN.

Tal como se usa en la presente, una “nucleasa efectora tipo activadora de la transcripción” (TALEN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN TALE y un dominio de escisión de ADN, tal como una endonucleasa FokI. Un “dominio de unión a ADN TALE” o “TALE” está compuesto por uno o más dominios/unidades de repetición TALE, cada uno

de los cuales en general tiene una secuencia de 33-35 aminoácidos altamente conservada excepto por los aminoácidos 12 y 13 que son divergentes. Los dominios de repetición TALE están involucrados en la unión de TALE a una secuencia de ADN diana. Los residuos de aminoácidos divergentes, denominados dirresiduos de repetición variable (RVD), se correlacionan con un reconocimiento de nucleótidos específico. Se ha determinado el código natural (canónico) para el reconocimiento de ADN de estos TALE de manera tal que una secuencia HD (histidina-ácido aspártico) en las posiciones 12 y 13 del TALE conduce a la unión de TALE a citosina (C), NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T, NI (asparagina-isoleucina) a A, NN (asparagina-asparagina) se une a un nucleótido G o A, y NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T. Los RVD no canónicos (atípicos) también son bien conocidos en la materia (por ejemplo, la publicación de Patente de los EEUU N°: US 2011/0301073, cuyos RVD atípicos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia). Se pueden usar TALEN para dirigir rupturas de la hebra doble específicas del sitio (DSB) en el genoma de células T. La unión de extremos no homólogos (NHEJ) une el ADN de ambos lados de una ruptura de hebra doble en donde hay poca o ninguna superposición de secuencias para el alineamiento, introduciendo de esa manera errores que noquean la expresión del gen. Como alternativa, una reparación dirigida por homología puede introducir un transgen en el sitio de la DSB siempre que haya secuencias flanqueadoras homólogas en el transgen. En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza usando una molécula TALEN.

Tal como se usa en la presente, un sistema de nucleasas de “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas/Cas” (CRISPR/Cas) se refiere a un sistema que emplea una nucleasa Cas guiada por CRISPR ARN (ARNcr) para reconocer sitios diana en un genoma (conocida como protoespaciadores) por medio de complementariedad de apareamiento de bases y para luego escindir el ADN si hay un motivo asociado al protoespaciador (PAM) conservado, corto, inmediatamente después del extremo 3’ terminal de la secuencia diana complementaria. Los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en tres tipos (es decir, tipo I, tipo II y tipo III) basado en la secuencia y estructura de las nucleasas Cas. Los complejos de vigilancia guiados por ARNcr en los tipos I y III necesitan múltiples subunidades Cas. El sistema Tipo II, el más

estudiado, comprende por lo menos tres componentes: una nucleasa Cas9 guiada por ARN, un ARNcr y un ARNtracr que actúa en trans (ARNtracr). El ARNtracr comprende una región formadora de dúplex. Un ARNcr y un ARNtracr forman un dúplex que tiene la capacidad para interactuar con una nucleasa Cas9 y guiar el complejo Cas9/ARNcr:ARNtracr hacia un sitio específico en el ADN diana por medio de apareamiento de bases de Watson-Crick entre el espaciador en el ARNcr y el protoespaciador en el ADN diana corriente arriba con respecto a un PAM. La nucleasa Cas9 escinde una ruptura de hebra doble dentro de una región definida por el espaciador ARNcr. La reparación con NHEJ da como resultado inserciones y/o supresiones que interrumpen la expresión del locus diana. Como alternativa, se puede introducir un transgen con secuencias flanqueadoras homólogas en el sitio de DSB por medio de una reparación dirigida por homología. El ARNcr y el ARNtracr se pueden manipular para formar un ARN guía simple (ARNgs o ARNg) (por ejemplo, Jinek y col., (2012) *Science* 337: 816-821). Además, se puede alterar o programar la región del ARN guía complementario del sitio diana para dirigirla a una secuencia deseada (Xie y col., (2014) *PLOS One* 9: e100448, publicación de Patente de los EEUU N°: US 2014/0068797, publicación de Patente de los EEUU N°: US 2014/0186843, Patente de los EEUU N°: 8.697.359 y publicación PCT N°: WO 2015/071474). En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza usando un sistema de nucleasas CRISPR/Cas.

Algunos ejemplos de secuencias de ARNg y de métodos para usar las mismas para noquear genes endógenos que codifican proteínas de células inmunológicas incluyen las que se describe en Ren y col., (2017) *Clin. Cancer Res.*, 23: 2255-2266, que provee ejemplos de ARNg, ADN CAS9, vectores y técnicas de noqueo de genes que son representativos.

Tal como se usa en la presente, una “meganucleasa”, también conocida como “endonucleasa dirigida [*homing*]”, se refiere a una endodesoxirribonucleasa caracterizada por un sitio de reconocimiento grande (secuencias de ADN de hebra doble de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 40 pares de bases). Las meganucleasas se pueden dividir en cinco familias en base a la secuencia y motivos de estructura: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, motivo His-Cys y PD-(D/E)XK. Algunos ejemplos de meganucleasas incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, RI-SceI, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII, cuyas secuencias de

reconocimiento son bien conocidas (por ejemplo, las Patentes de los EEUU N°: 5.420.032 y 6.833.252, Belfort y col., (1997) *Nucl. Acids Res.*, 25: 3379-3388, Dujon y col., (1989) *Gene* 52: 115-118, Perler y col., (1994) *Nucl. Acids Res.*, 22: 1125-1127, Jasin (1996) *Trends Genet.*, 72: 224-228, Gimble y col., (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180, y Argast y col., (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353).

En algunas formas de realización, las meganucleasas naturales se pueden usar para promover una modificación del genoma específica del sitio de una diana de interés, tal como un punto de control inmunológico, un gen que codifica HLA o un gen que codifica un componente de un TCR.

En otras formas de realización, se usa una meganucleasa modificada que presenta una nueva especificidad de unión por un gen diana para realizar una modificación del genoma específica del sitio (véase, por ejemplo, Porteus y col., (2005) *Nat. Biotechnol.* 23: 967-73, Sussman y col., (2004) *J. Mol. Biol.* 342: 31-41, Epinat y col., (2003) *Nucl. Acids Res.*, 37: 2952-2962, Chevalier y col., (2002) *Mol. Cell* 70: 895-905, Ashworth y col., (2006) *Nature* 441: 656-659, Paques y col., (2007) *Curr. Gene Ther.*, 7: 49-66, y las publicaciones de Patentes de los EEUU N°: US 2007/0117128, US 2006/0206949, US 2006/0153826, US 2006/0078552 y US 2004/0002092). En formas de realización adicionales, se genera un noqueo de un gen cromosómico usando una endonucleasa dirigida que ha sido modificada con dominios de unión de ADN modulares de TALEN para obtener una proteína de fusión conocida como megaTAL. Las MegaTAL no solo se pueden utilizar para noquear uno o más genes diana, sino también para introducir (*knock in*) polinucleótidos heterólogos o exógenos cuando se usan en combinación con un molde donante exógeno que codifica un polipéptido de interés.

En algunas formas de realización, un noqueo de un gen cromosómico comprende una molécula de ácido nucleico inhibidora que se introduce en una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica) que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un receptor específico del antígeno que se une (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, en donde dicha molécula de ácido nucleico inhibidora codifica un inhibidor específico de la diana y en donde el inhibidor específico de la diana codificado inhibe la expresión de un gen endógeno (es decir, de un punto de control inmunológico, un componente de

HLA o un componente de TCR, o cualquier combinación de los mismos) en la célula huésped inmunológica.

El noqueo de un gen cromosómico se puede confirmar de manera directa mediante secuenciación de ADN de la célula huésped inmunológica después de usar el procedimiento o agente de noqueo.

Los noqueos de un gen cromosómico también se pueden inferir a partir de la ausencia de expresión del gen (por ejemplo, ausencia de un ARNm o de un producto polipeptídico codificado por el gen) después del noqueo.

En algunas formas de realización, una célula huésped de la presente invención es capaz de matar de manera específica y/o selectiva al 50 % o más de las células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC.

En algunas formas de realización, la célula inmunológica modificada puede producir una citoquina cuando se pone en contacto con células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula de MHC.

En algunas formas de realización, la citoquina comprende IFN- γ o IL2. En algunas formas de realización, la citoquina comprende TNF- α .

En algunas formas de realización, la célula huésped puede producir un nivel mayor de citoquinas o de una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que presenta expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ a un nivel menor o igual a aproximadamente 1.000 transcriptos por millón de transcriptos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como menor o igual a aproximadamente 1.000

TPM a menos o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se denomina "expresión heterocigota" lo cual equivale a entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango entre estos valores, inclusive, tal como 1-32 TPM. Por ejemplo, la célula huésped tiene la capacidad para producir un nivel de citoquinas o de una molécula citotóxica que es por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces o más, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como entre 1,2 veces y 2 veces más alto.

En algunas formas de realización, la célula huésped tiene la capacidad para matar de manera específica y/o selectiva una célula diana que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉ (por ejemplo, una célula hiperproliferativa que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉). En determinadas formas de realización, la célula diana expresa: (i) un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos YMLDLQPET; y (ii) una molécula del MHC correspondiente.

En algunas formas de realización, las células huésped no expresan el antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, no son reconocidas por una proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, no son del serotipo HLA-A*02 y/o no expresan un alelo HLA-A*02, tal como el alelo HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, o HLA-A*02:07. Por ejemplo, un paciente puede recibir células huésped de un donante sano que es HPV16 E7₁₁₋₁₉ negativo o HLA-A*02:01 negativo. Como fuente de material de trasplante se pueden usar células madre, por ejemplo las células madre hematopoyéticas, aisladas de ese donante (o células autólogas modificadas). Paralelamente, las células T aisladas del mismo donante se pueden modificar genéticamente para que reconozcan HPV16 E7₁₁₋₁₉, por ejemplo expresando una proteína de unión a HPV16 E7₁₁₋₁₉ según se describe en la presente. Las células madre del donante se pueden usar para injertar poblaciones de células, por ejemplo un sistema inmunitario reconstituido, en el paciente y las células huésped se pueden infundir en el paciente con el objetivo de provocar un efecto antitumoral altamente específico. Las células T del donante

modificadas se pueden diseñar de manera que reconozcan y eliminen células que expresan HPV16 E7₁₁₋₁₉, por ejemplo todas las células sanguíneas nativas del paciente, incluyendo, por ejemplo, células cancerosas tal como células residuales de leucemia, que son HPV16 E7₁₁₋₁₉ positivas, previniendo así la recaída y promoviendo curas completas. Debido a que las nuevas

5 células sanguíneas sanas del paciente se derivan del donante y, por lo tanto, son ya sea negativas para HPV16 E7₁₁₋₁₉, negativas para el serotipo HLA-A*02 y/o negativas para HLA-A*02:01, las células modificadas que se describen en la presente pueden presentar efectos secundarios tóxicos mínimos. Dichas células huésped adaptadas del paciente y los métodos de tratamiento se pueden usar de acuerdo con los métodos terapéuticos que se describirán más adelante.

10 En algunas formas de realización, la muerte se determina mediante un ensayo de muerte celular. En alguna forma de realización, el ensayo de muerte celular se lleva a cabo mediante cocultivo de la célula huésped y la célula diana a una relación de entre 20:1 y 0,625:1, por ejemplo, entre 15:1 y 1,25:1, entre 10:1 y 1,5:1, entre 8:1 y 3:1, entre 6:1 y 5:1, entre 20:1 y 5:1, entre 10:1 y 2,5:1 etc.. En algunas formas de realización, la célula diana es pulsada con entre 1

15 µg/ml y 50 pg/ml del péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉, por ejemplo, entre 1 ug/ml y 10 ng/ml, entre 500 ng/ml y 0,5 ng/ml, entre 10 ng/ml y 10 pg/ml, entre 250 ng/ml y 1 ng/ml, entre 50 ng/ml y 5 ng/ml, entre 20 ng/ml y 10 ng/ml, etc.

En algunas formas de realización, la célula huésped tiene la capacidad para matar un mayor número de células diana cuando se pone en contacto con células diana que tienen un nivel

20 de HPV16 E7₁₁₋₁₉ menor o igual a aproximadamente 1.000 transcriptos por millón de transcriptos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27

25 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como menor o igual a entre aproximadamente 1.000 TPM y menor o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de

HPV16 E7₁₁₋₁₉ se denomina “expresión heterocigota”, lo que significa entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango intermedio, incluyendo, por ejemplo, a 1-32 TPM. Por ejemplo, la célula huésped puede matar por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces o más, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como entre 1,2 veces y 2 veces, más células diana.

La presente invención provee además una población de células que comprende por lo menos una célula huésped descrita en la presente. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera entre los vectores de expresión recombinantes descritos, además de por lo menos una célula adicional, por ejemplo, una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, células epiteliales, una célula muscular, una célula de cerebro, etc. Como alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en donde dicha población comprende fundamentalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonales, en donde todas las células de la población son clones de una sola célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de manera tal que todas las células de la población comprenden dicho vector de expresión recombinante. En una forma de realización de la presente invención, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante descrito en la presente.

En una forma de realización de la presente invención, se puede expandir rápidamente la cantidad de células en la población. La expansión de la cantidad de células T se puede llevar a cabo mediante cualquiera de numerosos métodos que son bien conocidos en la materia (por

ejemplo, las Patentes de los EEUU N°: 8.034.334 y 8.383.099, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2012/0244133, Dudley y col., (2003) *J. Immunother.* 26: 332-242, y Riddell y col., (1990) *J. Immunol. Methods* 128: 189-201). Por ejemplo, la expansión de la cantidad de células T se puede llevar a cabo mediante cultivo de las células T con el anticuerpo OKT3, IL-2 y PBMC
5 alimentadoras (por ejemplo, PBMC alogénicas irradiadas).

V. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto incluido en la presente invención, aquí se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones que se describen en la presente (por ejemplo,
10 proteínas de unión, ácidos nucleicos, células y semejantes) y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellos agentes, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para utilizar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una
15 toxicidad, una irritación o una respuesta alérgica excesiva, y sin otros problemas o complicaciones, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

Los agentes y otras composiciones de la presente invención se pueden formular especialmente para una administración en una forma sólida o líquida, inclusive aquellas adaptadas para varias rutas de administración, tales como (1) una administración oral, por
20 ejemplo, suspensiones orales (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas; (2) una administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa tal como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril; (3) una aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o aerosol aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o
25 espuma; o (5) un aerosol, por ejemplo, como un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen al compuesto. Se contempla cualquier forma apropiada de un agente o composición que se describe en la presente, tal como, pero en un sentido no taxativo, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas.

Las composiciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención se pueden

presentar como formas de dosificación discretas, tales como cápsulas, sachets o comprimidos, o como líquidos o rociados en aerosol cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo como un polvo o en gránulos, una solución, o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite-en-agua, una emulsión líquida de agua-en-aceite, polvos para reconstituir, polvos para consumo oral, botellas (que incluyen polvos o líquidos en una botella), películas de disolución oral, pastillas, pastas, tubos, gomas y envases. Dichas formas de dosificación se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia.

Los excipientes adecuados incluyen agua, salina, dextrosa, glicerol o semejantes y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden las células huésped, proteínas de unión o proteínas de fusión que se divulgan en la presente comprenden además un medio de infusión adecuado. Los medios de infusión adecuados pueden comprender cualquier formulación de un medio isotónico, típicamente salina normal, Normosol™ -R (Abbott) o Plasma-Lyte™ A (Baxter), también se puede utilizar dextrosa al 5% en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede suplementar con albúmina de suero humano u otros componentes del suero humano. También se contemplan dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula huésped o de una composición.

En la presente también se proveen dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula huésped o de una composición que comprende la célula huésped. Tal como se describe en la presente, las células huésped incluyen células inmunológicas, células T (células T CD4⁺ y/o células T CD8⁺), linfocitos citotóxicos (por ejemplo, células T citotóxicas y/o células asesinas naturales (NK)) y semejantes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una dosis unitaria comprende una composición que comprende por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%), por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% de células modificadas, ya sea solas o en combinación con otras células, tal como que comprenden por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%), por lo menos

aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90% o por lo menos aproximadamente 95% de otras células. En algunas formas de realización, hay una cantidad reducida o sustancialmente ninguna célula no deseada, tal como menos que aproximadamente 50%, menos que aproximadamente 40%, menos que aproximadamente 30%, menos que aproximadamente 20%, menos que aproximadamente 10%, menos que aproximadamente 5% o menos que aproximadamente 1% de la población de células en la composición.

La cantidad de células en la composición o dosis unitaria comprende por lo menos una célula (por ejemplo, por lo menos una célula T CD8⁺ modificada, una célula T CD4⁺ modificada y/o una célula NK) o más típicamente la cantidad es mayor que 10² células, por ejemplo, hasta 10⁶, hasta 10⁷, hasta 10⁸ células, hasta 10⁹ células o más de 10¹⁰ células. En algunas formas de realización, la células se administran en un rango entre aproximadamente 10⁶ y aproximadamente 10¹⁰ células/m², tal como en un rango entre aproximadamente 10⁵ y aproximadamente 10⁹ células/m². El número de células dependerá del uso final pretendido de la composición así como del tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, las células modificadas para contener una proteína de unión específica de un antígeno particular comprenderá una población de células que contiene por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de dichas células. Para los usos provistos en la presente, las células en general se encuentran en un volumen de un litro o menos, 500 ml o menos, 250 ml o menos o 100 ml o menos. En algunas formas de realización, la densidad de las células deseadas típicamente es mayor que 10⁴ células/ml y en general es mayor que 10⁷ células/ml, generalmente 10⁸ células/ml o mayor. Las células se pueden administrar como una sola infusión o en múltiples infusiones sobre un rango de tiempo. El número clínicamente relevante de células inmunológicas se puede distribuir en múltiples infusiones que acumuladas son iguales o exceden 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ o 10¹¹ células. En algunas formas de realización, una dosis unitaria de las células inmunológicas modificadas se puede coadministrar (por ejemplo, de manera simultánea o contemporánea) con células madre hematopoyéticas de un donante alogénico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad o condición a tratar (o prevenir) determinada por los expertos en el arte de la

medicina. La dosis apropiada y la duración y frecuencia de administración adecuadas de las composiciones se determinarán mediante factores tales como el estado de salud del paciente, el tamaño del paciente (es decir, peso, masa o área corporal), el tipo y la severidad de la condición del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración. En general, la dosis y el régimen de tratamiento apropiados proveen la(s) composición(es) en una cantidad suficiente como para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (tal como se describe en la presente, que incluye un resultado clínico mejorado, tales como remisiones completas o parciales más frecuentes, o una supervivencia sin enfermedad y/o global más prolongada o una disminución de la severidad de los síntomas).

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica se refiere a una cantidad suficiente, a dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios, para alcanzar los resultados clínicos deseados o un tratamiento beneficioso, como se describe en la presente. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Si la administración es a un sujeto que ya se sabe o que se ha confirmado que padece una enfermedad o un estado de enfermedad, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se puede usar con referencia al tratamiento, en tanto una “cantidad profilácticamente eficaz” se puede usar para describir la administración de una cantidad eficaz a un sujeto que es susceptible o que tiene el riesgo de desarrollar una enfermedad o estado de enfermedad (por ejemplo, una recurrencia) como un curso preventivo.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, tal como en ampollas o viales sellados. Dichos recipientes se pueden congelar para preservar la estabilidad de la formulación hasta el momento de su infusión en el paciente. En algunas formas de realización, una dosis unitaria comprende una célula huésped descrita en la presente a una dosis de entre aproximadamente 10^7 células/m² y aproximadamente 10^{11} células/m². El desarrollo de los regímenes adecuados de dosificación y tratamiento para usar las composiciones particulares que se describen en la presente en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, una administración o formulación parenteral o intravenosa.

Si la presente composición se administra por vía parenteral, la composición también puede incluir una solución o suspensión acuosa u oleaginosa estéril. Los diluyentes o solventes no

tóxicos parenteralmente aceptables adecuados incluyen agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, 1,3-butanodiol, etanol, propilenglicol o polietilenglicoles en mezclas con agua. Las soluciones o suspensiones acuosas pueden comprender además uno o más agentes amortiguadores, tales como acetato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o tartrato de sodio.

5 Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier formulación de una unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida. Una forma de dosificación unitaria, tal como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias
10 para el sujeto a tratar; en donde cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de células inmunológicas modificadas o del compuesto activo que se calcula para producir el efecto deseado en asociación con un vehículo farmacéutico apropiado.

En algunas formas de realización, cuando se administra a un sujeto la composición farmacéutica descrita, esta puede generar una respuesta inmunológica contra una célula de
15 interés que expresa HPV16 E7₁₁₋₁₉. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser de utilidad como vacunas para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un
20 coadyuvante fisiológicamente aceptable. En algunas formas de realización, el coadyuvante que se emplea provee una mayor inmunogenicidad de la composición farmacéutica. Dicho compuesto o coadyuvante estimulante de la respuesta inmunitaria adicional (i) se puede mezclar con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención después de la reconstitución de los péptidos y la emulsificación opcional con un coadyuvante a base de aceite según se definió
25 precedentemente, (ii) puede ser parte de la composición de reconstitución abarcada por la presente invención definida precedentemente, (iii) puede unirse físicamente al péptido o péptidos a reconstituir o (iv) se puede administrar por separado al sujeto, mamífero o ser humano, a tratar. El coadyuvante puede ser uno que provea una liberación lenta del antígeno (por ejemplo, el coadyuvante puede ser un liposoma), o puede ser un coadyuvante que sea inmunogénico por

derecho propio, por lo que funcione sinérgicamente con los antígenos. Por ejemplo, el coadyuvante puede ser un coadyuvante conocido u otra sustancia que promueva la captación de antígenos, reclute células del sistema inmunitario en el sitio de administración o facilite la activación inmunitaria de las células linfoides que responden. Los coadyuvantes incluyen, pero de manera no taxativa, moléculas inmunomoduladoras (por ejemplo, citoquinas), emulsiones de aceite y agua, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, bactoadyuvante, polímeros sintéticos como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina y dipéptido muramilo. En algunas formas de realización, el coadyuvante es el coadyuvante 65, α -GalCer, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido β -glucano, ADN CpG, GM-CSF, GPI-0100, IFA, IFN- γ , IL-17, lípido A, lipopolisacárido, Lipovant, Montanide™, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, pam3CSK4, quil A, dimicolato de trehalosa o zimosano.

En algunas formas de realización, el coadyuvante es una molécula inmunomoduladora. Por ejemplo, la molécula inmunomoduladora puede ser una proteína recombinante, citoquina, quimioquina o un agente inmunoestimulador o ácido nucleico que codifica citoquinas, quimioquinas o agentes inmunoestimuladores diseñados para potenciar la respuesta inmunológica.

Algunos ejemplos de citoquinas inmunomoduladoras incluyen interferones (por ejemplo, IFN α , IFN β e IFN γ), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-20), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF α y TNF β), eritropoyetina (EPO), ligando FLT-3, glp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1.alpha., MIP-1 β , Rantes, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como fragmentos funcionales de cualquiera de los anteriores.

En algunas formas de realización, en las composiciones que se proveen aquí también se puede incluir una quimioquina inmunomoduladora que se une a un receptor de quimioquina, es decir, un receptor de quimioquina CXC, CC, C o CX3C. Algunos ejemplos de quimioquinas incluyen, pero de manera no taxativa, Mip1 α , Mip-1 β , Mip-3 α (Larc), Mip-3 β , Rantes, Hcc-1, Mpif-1, Mpif-2, Mcp-1, Mcp-2, Mcp-3, Mcp-4, Mcp-5, Eotaxin, Tarc, Elc, I309, IL-8, Gcp-2 Gro- α , Gro- β ,

Gro- γ , Nap-2, Ena-78, Gcp-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1, y Bca-1 (Blc), así como fragmentos funcionales de cualquiera de las anteriores.

En algunas formas de realización, la composición comprende una proteína de unión (por ejemplo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un CAR o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector), un polipéptido TCR α y/o TCR β que se describe en la presente. En algunas formas de realización, la composición comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCR α y/o TCR β que se describe en la presente, por ejemplo una molécula de ADN que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCR α y/o TCR β . En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCR α y/o TCR β .

Cuando es captada por una célula (por ejemplo, células T, células NK, etc.), una molécula de ADN puede estar presente en la célula como una molécula extracromosómica y/o puede integrarse al cromosoma. El ADN se puede introducir en las células en la forma de un plásmido que puede permanecer como material genético separado. Como alternativa, se pueden introducir en la célula los ADN lineales que pueden integrarse al cromosoma. Opcionalmente, cuando se introduce ADN en una célula, se pueden añadir reactivos que promuevan la integración del ADN a los cromosomas.

20 VI. Usos y Métodos

Las composiciones que se describen en la presente se pueden usar en una variedad de aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. En cualquier método según se describe en la presente, tal como un método de diagnóstico, método de pronóstico, método terapéutico o una combinación de los mismos, todos los pasos del método pueden ser realizados por un solo actor o, como alternativa, por más de un actor.. Por ejemplo, el diagnóstico lo puede realizar directamente el actor que provee el tratamiento terapéutico. Como alternativa, una persona que provee un agente terapéutico puede solicitar que se realice un ensayo de diagnóstico. El diagnosticador y/o el intervencionista terapéutico pueden interpretar los resultados del ensayo de diagnóstico para determinar una estrategia terapéutica. De manera similar, estos procesos

alternativos se pueden aplicar a otros ensayos, tales como los ensayos de pronóstico.

En algunos usos y métodos que abarca la presente invención, se utilizan sujetos o muestras de sujetos. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal. El animal puede ser de cualquier sexo y puede estar en cualquier etapa de su desarrollo. En algunas formas de realización, el animal es un vertebrado, por ejemplo un mamífero. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal domesticado, por ejemplo un perro, gato, vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de compañía, por ejemplo un perro o un gato. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de ganado, como una vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de zoológico. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de investigación, por ejemplo un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), un perro, un cerdo o un primate no humano. En algunas formas de realización, el animal es un animal modificado genéticamente. En algunas formas de realización, el animal es un animal transgénico (por ejemplo, ratones transgénicos y cerdos transgénicos). En algunas formas de realización, el sujeto es un pez o un reptil.

En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor, por ejemplo un ratón. En algunas de tales formas de realización, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas del MHC humano (es decir, HLA) (por ejemplo, Nicholson y col. (2012) Adv. Hematol. 2012: 404081). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humano o es un ratón antígeno negativo (por ejemplo, Li y col. (2010) Nat. Med. 16: 1029-1034 y Obenaus y col. (2015) Nat. Biotechnol 33: 402-407). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de la HLA humanas y TCR humanos. En algunas formas de realización, tal como donde el sujeto es un ratón transgénico para HLA, se modifican los TCR identificados, por ejemplo, para que sean quiméricos o humanizados. En algunas formas de realización, el andamiaje de TCR se ha modificado, de manera análoga a los métodos conocidos de humanización de proteínas de unión.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ (por ejemplo, un trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de

un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉). Por ejemplo, el modelo animal puede ser un modelo animal con xenoinjertos ortotópicos de un cáncer derivado de un ser humano.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano, tal como un humano con un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉.

Los métodos que se describen en la presente se pueden usar para tratar a un sujeto que lo necesita. Tal como se usa en la presente, un “sujeto que lo necesita” incluye cualquier sujeto que padece un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, una recaída de un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o que tiene predisposición a padecer un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉. Tal como se lo describe en la presente, un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ puede ser un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

En algunas formas de realización de los métodos que abarca la presente invención, el sujeto no ha sido sometido a un tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, como quimioterapia, radioterapia, terapia direccionada y/o inmunoterapias. En algunas formas de realización, el sujeto ha sido sometido a un tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, como quimioterapia, radioterapia, terapia direccionada y/o inmunoterapias.

En algunas formas de realización, el sujeto ha sido sometido a una cirugía para extirpar tejido canceroso o precanceroso. En algunas formas de realización, el tejido canceroso no se ha eliminado, por ejemplo, el tejido canceroso puede estar ubicado en una región inoperable del cuerpo, por ejemplo en un tejido que es esencial para la vida, o en una región donde un procedimiento quirúrgico causaría una considerable riesgo de daño al paciente.

En algunas formas de realización, el sujeto o las células del mismo son resistentes a una terapia de relevancia, por ejemplo pueden ser resistentes a la terapia estándar de atención, terapia con inhibidores de puntos de control inmunológico, y semejantes. Por ejemplo, la modulación de uno o más biomarcadores que abarca la presente invención puede superar la resistencia a la terapia con inhibidores de puntos de control inmunológico.

En algunas formas de realización, los sujetos necesitan una modulación de acuerdo con las composiciones y métodos que se describen en la presente, por ejemplo puede haber sido detectado que presentan una ausencia, presencia o expresión aberrante de HPV16 E7₁₁₋₁₉ que no se desea.

5

a. Métodos de diagnóstico

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o una célula de interés que exprese HPV16 E7₁₁₋₁₉, que comprenden detectar la presencia o ausencia de dicho antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en una muestra mediante el uso de por lo menos una proteína de unión, o por lo menos una célula huésped según se describe en la presente. En algunas formas de realización, el método comprende además obtener la muestra (por ejemplo, de un sujeto). En algunas formas de realización, por lo menos una proteína de unión o por lo menos una célula huésped forma un complejo con un epítopo peptídico HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una molécula del MHC, y la detección del complejo se realiza en forma de una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de radioinmunidad (RIA), inmunoquímicamente, transferencia de Western o un ensayo de flujo intracelular.

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen métodos de diagnóstico para detectar el nivel de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto, que comprende: a) poner en contacto una muestra obtenida del sujeto con por lo menos una proteína de unión, por lo menos una célula huésped, o una población de células huésped según se describen en la presente; y b) detectar el nivel de reactividad, donde un mayor nivel de reactividad en comparación con un nivel de control indica el nivel de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un HPV16 E7₁₁₋₁₉ antígeno en el sujeto.

En algunas formas de realización, el nivel de reactividad está indicado por activación o la función efectora de células T, tal como, pero en un sentido no taxativo, la proliferación, la

citotoxicidad o la liberación de citoquinas de células T. El nivel de control puede ser un número o un nivel de referencia de un sujeto sano que no está expuesto a un trastorno no alineado, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

5 para determinar la presencia y el nivel de una respuesta inmunitaria a un antígeno peptídico (por ejemplo, un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉) se puede obtener una muestra biológica de un sujeto según se describe en la presente. Una "muestra biológica" puede ser una muestra de sangre (a partir de la cual se puede preparar suero o plasma), una muestra de biopsia, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, PBMC aisladas, células T aisladas, lavado pulmonar, de ascitis, 10 lavados de mucosas, líquido, etc.), médula ósea, ganglios linfáticos, tejido explantado, cultivo de órganos, o cualquier otro tejido o preparado celular procedente del sujeto o de una fuente biológica. También se pueden obtener muestras biológicas del sujeto antes de que reciba cualquier composición farmacéutica, donde dicha muestra biológica es útil como control para establecer datos de línea basal.

15 Las respuestas de las células T específicas de antígeno por lo general se determinan por comparación de las respuestas de células T observadas de acuerdo con cualquiera de los parámetros funcionales de células T que se describen en la presente (por ejemplo proliferación, liberación de citoquinas, actividad de CTL, alteraciones en fenotipos de marcadores en la superficie celular, etc.) que se pueden realizar entre células T expuestas a un antígeno cognado 20 en un contexto apropiado (por ejemplo, el antígeno utilizado para cebar o activar las células T, cuando es presentado por células presentadoras de antígeno inmunocompatibles) y células T de la misma población de origen que en cambio se exponen a un antígeno de control estructuralmente distinto o irrelevante. Una respuesta al antígeno cognado que es mayor, con significación estadística, que la respuesta al antígeno de control significa que hay especificidad de 25 antígeno.

El nivel de una respuesta inmunitaria, por ejemplo la respuesta inmunitaria de una célula T citotóxica (CTL), se puede determinar mediante cualquiera de los numerosos métodos inmunológicos que se describen en la presente y se practican de manera rutinaria en la materia. Por ejemplo, se puede determinar el nivel de una respuesta inmunitaria de la CTL antes y después

de administrar cualquiera de las proteínas de unión que se describen en la presente expresadas, por ejemplo, por una célula T. Los ensayos de citotoxicidad para determinar la actividad de la CTL se pueden realizar utilizando cualquiera de varias técnicas y métodos que se practican de manera rutinaria en este campo (por ejemplo, Henkart y col., *"Cytotoxic T-Lymphocytes"* en Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), páginas 1127-50, y referencias que se citan allí)

La presente invención provee, en parte, métodos, sistemas y códigos para clasificar con precisión si una muestra biológica está asociada con un resultado de interés, tal como la expresión de una diana de interés, por ejemplo HPV16 E7₁₁₋₁₉. En algunas formas de realización, la presente invención es útil para clasificar una muestra (por ejemplo, proveniente de un sujeto) como asociada o en riesgo de responder o no responder a la terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ utilizando un algoritmo estadístico y/o datos empíricos.

Un ejemplo de método para detectar la cantidad o actividad de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y, por lo tanto, útil para clasificar si es probable o improbable que una muestra responda a una terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ incluye poner en contacto una muestra biológica con un agente, por ejemplo un péptido inmunogénico HPV16 E7₁₁₋₁₉ o un agente de unión según se describe en la presente, capaz de detectar la cantidad o actividad de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en la muestra biológica. En algunas formas de realización, el método además comprende obtener una muestra biológica, por ejemplo de un sujeto de prueba. En algunas formas de realización, se usa por lo menos un agente, y se pueden utilizar dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de dichos agentes en combinación (por ejemplo, en ELISA tipo sándwich) o en serie. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema de clasificación estadística de aprendizaje único. Por ejemplo, se puede utilizar un único sistema de clasificación estadística de aprendizaje para clasificar una muestra basándose en un valor de predicción o probabilidad y la presencia o el nivel del biomarcador. En el uso de un único sistema de clasificación estadística con aprendizaje por lo general se clasifica la muestra en base a una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o precisión general de por lo menos aproximadamente 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %.

85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %.

Los especialistas en la materia conocen bien otros algoritmos estadísticos apropiados. Por ejemplo, los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen una técnica algorítmica de aprendizaje automático capaz de adaptarse a conjuntos de datos complejos (por ejemplo, un panel de marcadores de interés) y pueden tomar decisiones basadas en dichos conjuntos de datos. En algunas formas de realización, se usa un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único, tal como un árbol de clasificación (por ejemplo, bosque aleatorio). En otras formas de realización, se usa una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, preferiblemente en tándem. Algunos ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen, pero de manera no taxativa, a aquellos que utilizan el aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación como bosques aleatorios, árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles potenciados, etc.), aprendizaje Correcto Probablemente Aproximadamente (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (ANN), redes neuro difusas (NFN), estructuras de red, perceptrones tales como perceptrones multicapa, redes de alimentación directa multicapa, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en redes de creencias, etc.), aprendizaje reforzado (por ejemplo, aprendizaje pasivo en un entorno conocido como el aprendizaje ingenuo, aprendizaje dinámico adaptativo y aprendizaje de diferencias temporales, aprendizaje pasivo en un entorno desconocido, aprendizaje activo en un entorno desconocido, aprendizaje de funciones de acción-valor, aplicaciones de aprendizaje reforzado, etc.), y algoritmos genéticos y programación evolutiva. Otros sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen máquinas de vectores de soporte (por ejemplo, métodos Kernel), splines de regresión adaptativa multivariante (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas gaussianas, algoritmos de descenso de gradientes y aprendizaje por cuantificación vectorial (LVQ). En ciertas formas de realización, el método abarcado por la presente invención comprende además el envío de los resultados de la clasificación de la muestra a un médico, por ejemplo, un oncólogo.

En algunas formas de realización, el diagnóstico de un sujeto (por ejemplo, incluyendo la tipificación de HLA y/o la pérdida de heterocigosidad (LOH) para determinar la compatibilidad con

el la unión al complejo de TCR-HLA por los TCR de interés) es seguido por la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento definido basado en el diagnóstico.

En algunas formas de realización, los métodos incluyen además la obtención de una muestra biológica de control (por ejemplo, una muestra biológica de un sujeto que no padece un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, un sujeto que está en remisión, un sujeto cuyo trastorno es susceptible de terapia, un sujeto cuyo trastorno está progresando u otros temas de interés).

En algunas formas de realización de los métodos analíticos que se describen en la presente, la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ (por ejemplo, en una muestra de un sujeto) se compara con una muestra de control predeterminada (estándar). La muestra del sujeto es típicamente de un tejido enfermo, por ejemplo células o tejidos cancerosos. La muestra de control puede ser del mismo sujeto o de un sujeto diferente. La muestra de control es típicamente una muestra normal, sin la enfermedad. Sin embargo, en algunas formas de realización, por ejemplo para la estadificación de una enfermedad o para evaluar la eficacia del tratamiento, la muestra de control puede ser de un tejido enfermo. La muestra de control puede ser una combinación de muestras de varios sujetos diferentes. En algunas formas de realización, la(s) medición(es) de la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en un sujeto se compara(n) con un nivel predeterminado. Este nivel predeterminado se obtiene típicamente de muestras normales. Según se describe en la presente, se puede usar una expresión "predeterminada" para, solo a manera de ejemplo, evaluar un sujeto que pueda ser seleccionado para el tratamiento, evaluar una respuesta al cáncer y/o evaluar una respuesta a una terapia combinada contra el cáncer. Se puede determinar una cantidad predeterminada de biomarcadores y/o medidas de actividad en poblaciones de pacientes con o sin un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉. La cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad pueden ser un solo número, que se puede aplicar por igual a cada paciente, o la cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad pueden variar dependiendo de las subpoblaciones específicas de pacientes. La edad, el peso, la altura y otros factores de un sujeto pueden afectar la cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad del individuo. Además, la cantidad y/o actividad predeterminada del

biomarcador se puede determinar para cada sujeto individualmente. En una forma de realización, las cantidades determinadas y/o comparadas en un método según se describe en la presente se basan en mediciones absolutas.

En otra forma de realización, las cantidades determinadas y/o comparadas en un método según se describe en la presente se basan en mediciones relativas, tales como relaciones (por ejemplo, números de copias de biomarcadores, nivel y/o actividad antes de un tratamiento en comparación con las posteriores al tratamiento, tales como mediciones de biomarcadores con relación a un control enriquecido o artificial, tales como mediciones de biomarcadores con relación a la expresión de un gen de mantenimiento y similares). Por ejemplo, el análisis relativo puede basarse en la relación entre mediciones de biomarcadores antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento. La medición de biomarcadores antes del tratamiento se puede realizar en cualquier momento antes del inicio de una terapia. La medición de biomarcadores después del tratamiento se puede realizar en cualquier momento después del inicio de la terapia. En algunas formas de realización, las mediciones de biomarcadores posteriores al tratamiento se realizan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas o más después del inicio de la terapia, e incluso más, y hasta durante un período indefinido, para un seguimiento continuo. El tratamiento puede comprender una terapia para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, ya sea solo o en combinación con otros agentes, tales como agentes anticancerosos como quimioterapia o inhibidores de puntos de control inmunológico.

La expresión predeterminada de HPV16 E7₁₁₋₁₉ puede ser cualquier estándar apropiado. Por ejemplo, la expresión predeterminada de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se puede obtener del mismo sujeto o de un sujeto diferente para el que se está evaluando una selección de sujetos. En una forma de realización, la cantidad de biomarcador predeterminada y/o las mediciones de actividad se pueden obtener a partir de una evaluación previa del mismo paciente. De esta manera, el progreso de selección del paciente se puede monitorear a lo largo del tiempo. Además, el control se puede obtener de una evaluación de otro ser humano o de múltiples seres humanos, por ejemplo, grupos seleccionados de seres humanos, si el sujeto es un ser humano. De tal manera, el alcance de la selección del ser humano para el que se está evaluando la selección se puede comparar con otros

seres humanos apropiados, por ejemplo, otros seres humanos que se encuentran en una situación similar a la del ser humano de interés, tales como aquellos que padecen enfermedades similares o la(s) misma(s) condición(es) y/o del mismo grupo étnico.

En algunas formas de realización, el cambio de la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ desde el nivel predeterminado es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, o 5,0 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive. Dichos valores de corte se aplican igualmente cuando la medición se basa en cambios relativos, como por ejemplo, en la relación de la medición de biomarcadores antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento.

En algunas formas de realización, la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se puede detectar y/o cuantificar detectando o cuantificando el polipéptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ o su antígeno, por ejemplo mediante el uso de una composición según se describe en la presente. El polipéptido se puede detectar y cuantificar mediante cualquiera de diversos medios bien conocidos por los especialistas en la materia, tales como inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, transferencia de Western, ensayos de ligando-ligando, técnicas inmunohistoquímicas, aglutinación, ensayos de complemento, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y otros similares (por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton y Lange, Norwalk, Connecticut, páginas 217-262, 1991).

b. Métodos Terapéuticos

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen métodos para prevenir y/o tratar un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, y/ o para inducir una respuesta inmunitaria contra una célula de interés, por ejemplo una célula hiperproliferativa, que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, por ejemplo por infección con una cepa de HPV, como HPV16. En algunas formas de realización, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células que expresan por lo

menos una proteína de unión según se describe en la presente. Los métodos abarcados por la presente invención también se pueden usar para determinar la capacidad de respuesta a la terapia para muchos trastornos diferentes caracterizados por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en sujetos, tales como aquellos que se describen en la presente.

5 En algunas formas de realización, el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un tipo de cáncer. Los términos “cáncer” o “tumor” o “hiperproliferativo” se refieren a la presencia de células que poseen las características típicas de las células que causan cáncer, tales como una proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial invasivo o metastásico, crecimiento rápido y determinados rasgos morfológicos característicos. En algunas formas de realización,
10 dichas células exhiben dichas características en parte o por completo debido a la expresión y actividad de las proteínas de los puntos de control inmunológicos, tales como PD-1, PD-L1, PD-L2 y/o CTLA-4.

Las células cancerosas a menudo se encuentran en la forma de un tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden comprender una célula cancerosa no
15 tumorigénica, tal como en un cáncer hematológico, como la leucemia. Tal como se usa en la presente, el término “cáncer” incluye tipos de cáncer premalignos así como malignos. Los tipos de cáncer incluyen, pero en un sentido no taxativo, una variedad de tipos de cáncer, carcinomas que incluyen los de la vejiga (incluido el cáncer de vejiga acelerado y metastásico), de mama, de colon (incluido cáncer colorrectal), de riñón, de hígado, de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células
20 pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículo, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (inclusive carcinoma del páncreas exócrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides y piel (inclusive carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma
25 de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide que incluyen leucemias mielogénicas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y

osteosarcoma; otros tumores que incluyen melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno en etapa III o IV no extirpable, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer

5 gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, cáncer de hueso, tumores óseos, histiocitoma fibroso

10 maligno óseo de adultos; histiocitoma fibroso maligno óseo de niños, sarcoma, sarcoma pediátrico, células asesinas naturales sinonasales, neoplasias, neoplasia de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor de células germinales testicular, melanoma intraocular, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, sarcoma sinovial, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica

15 aguda con cromosoma Filadelfia positivo (Ph+ ALL), mieloma múltiple, leucemia mielogénica aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado con una mastocitosis, y todas las metástasis de los mismos. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en humanos, así como mastocitoma de perros y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa,

20 eritrodérmica y teleangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, leucemia de mastocitos, además de otros tipos de cáncer. Hay otros tipos de cáncer que también están incluidos en el alcance de los trastornos incluyen, pero en un sentido no taxativo, los que siguen: carcinoma, inclusive los de la vejiga, carcinoma urotelial, de

25 mama, de colon, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, testículos, en particular seminomas testiculares, y de piel; inclusive carcinoma de células escamosas; tumores del estroma gastrointestinal ("GIST"); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células

pilosas y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, que incluyen leucemias mielogénicas aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, inclusive melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático, que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas refractarios a una quimioterapia y sarcoma de Kaposi, y todas las metástasis de los mismos. Otros ejemplos no

limitantes de tipos de tipos de cáncer aplicables a los métodos comprendidos por la presente invención incluyen sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de hueso, tumor de cerebro, carcinoma de pulmón (incluido el adenocarcinoma de pulmón), carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica) y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadenas pesadas. En algunas formas de realización, los tipos de cáncer son de naturaleza epitelial e incluyen, pero en un sentido no taxativo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, tipos de cáncer ginecológicos, cáncer renal, cáncer de laringe,

cáncer de pulmón, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de piel. En algunas formas de realización, el cáncer epitelial es cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales no papilares, carcinoma cervical, carcinoma de ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario seroso) o carcinoma de mama.

- 5 Los tipos de cáncer epiteliales se pueden caracterizar de otras diversas maneras que incluyen, pero en un sentido no taxativo, serosos, endometrioides, mucinosos, de células claras, de Brenner o no diferenciados. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas (avanzado), melanoma, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer urotelial de vejiga (avanzado), cáncer de riñón (RCC)
- 10 (avanzado), cáncer con gran inestabilidad por microsatélites, linfoma de Hodgkin clásico, cáncer gástrico (avanzado), cáncer de cuello uterino (avanzado), linfoma de células B del mediastino primario, carcinoma hepatocelular (avanzado), carcinoma de mama invasivo, carcinoma urotelial de vejiga y carcinoma de células de Merckell (avanzado).

Además, las composiciones que se describen en la presente también se pueden

15 administrar en terapia de combinación para modular adicionalmente una actividad que se desee. Los agentes adicionales incluyen, sin limitaciones, agentes quimioterapéuticos, hormonas, antiangiogénos, compuestos radiomarcados o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Los métodos de tratamiento anteriores se pueden administrar junto con otras formas de terapia convencionales (por ejemplo, tratamientos estándar de atención para el cáncer bien conocidos por

20 los especialistas en la técnica), ya sea consecutivamente con la terapia preconventional o posconventional. Por ejemplo, estos agentes moduladores se pueden administrar con una dosis terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, estos agentes moduladores se administran junto con quimioterapia para mejorar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. Physicians' Desk Reference (PDR) describe las dosis de agentes

25 quimioterapéuticos que se han utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerán del melanoma en particular que se esté tratando, de la extensión de la enfermedad y de otros factores familiares para el médico especialista en la técnica y que pueden ser determinados por el médico.

La terapia que usa una o más composiciones que se describen en la presente, ya sea solas o en combinación con otras terapias, como las terapias contra el cáncer, se puede usar para entrar en contacto con células que expresan HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o para administrarlas a un sujeto que se desea, tal como un sujeto con indicación de que es probable que responda a la terapia. En otra forma de realización, dicha terapia puede evitarse una vez que se indique que es probable que un sujeto no responda a la terapia (por ejemplo, según se evalúe de acuerdo con un método de diagnóstico o pronóstico descrito en la presente) y un régimen de tratamiento alternativo, por ejemplo se pueden recomendar y/o administrar terapias contra el cáncer direccionadas y/o no direccionadas.

El término "terapia direccionada" se refiere a la administración de agentes que interactúan selectivamente con una biomolécula seleccionada así para tratar el cáncer. Por ejemplo, la terapia direccionada con respecto a la inhibición del inhibidor del punto de control inmunológico es útil en combinación con los métodos que abarca la presente invención.

El término "inmunoterapia" o "inmunoterapias" se refiere en general a cualquier estrategia para modular una respuesta inmunológica de una manera beneficiosa y abarca el tratamiento de un sujeto que padece una recurrencia de una enfermedad o en riesgo de contraer o sufrir una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otra manera una respuesta inmunológica, así como cualquier tratamiento que utilice determinadas partes del sistema inmunológico de un sujeto para combatir enfermedades, como el cáncer. El propio sistema inmunológico del sujeto se estimula (o suprime), con o sin la administración de uno o más agentes para ese propósito. Las inmunoterapias que están diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunológica se denominan "inmunoterapias de activación". Las inmunoterapias que están diseñadas para reducir o suprimir una respuesta inmunológica se denominan "inmunoterapias de supresión". En algunas formas de realización, una inmunoterapia es específica para células de interés, como las células cancerosas. En algunas formas de realización, la inmunoterapia puede ser "no direccionada", lo que se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con las células del sistema inmunológico, pero modulan la función del sistema inmunológico. Algunos ejemplos representativos de terapias no direccionadas incluyen, sin limitación, quimioterapia, terapia génica y radioterapia.

Algunas formas de inmunoterapia son terapias direccionadas que pueden comprender, por ejemplo, el uso de vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos sensibilizadas. Por ejemplo, un virus oncolítico es un virus que puede infectar y lisar las células cancerosas, sin dañar las células normales, lo que los hace potencialmente útiles en la terapia del

5 cáncer. La replicación de los virus oncolíticos facilita la destrucción de las células tumorales y también produce una amplificación de la dosis en el sitio del tumor. También pueden actuar como vectores de genes anticancerígenos, lo que permite suministrarlos específicamente en el sitio del tumor. La inmunoterapia puede incluir inmunidad pasiva para la protección a corto plazo de un huésped, que se obtiene mediante la administración de un anticuerpo preformado dirigido contra

10 un antígeno de cáncer o antígeno de enfermedad (por ejemplo, la administración de un anticuerpo monoclonal, opcionalmente unido a un agente quimioterapéutico o toxina, a un antígeno tumoral). La inmunoterapia también puede centrarse en el uso de epitopes de líneas celulares cancerosas reconocidos por linfocitos citotóxicos. Como alternativa, se pueden usar polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos de triple hélice y

15 similares para modular selectivamente biomoléculas que están vinculadas con el inicio, el progreso y/o patología de un tumor o cáncer. De manera similar, la inmunoterapia puede tomar la forma de terapias basadas en células. Por ejemplo, la inmunoterapia celular adoptiva es un tipo de inmunoterapia que utiliza células inmunológicas, como las células T, que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente y luego se transfieren de nuevo al

20 paciente con cáncer. La inyección de un gran número de células T específicas del tumor activadas puede inducir una regresión completa y duradera de los tipos de cáncer.

La inmunoterapia puede incluir inmunidad pasiva para la protección a corto plazo de un huésped, que se obtiene mediante la administración de un anticuerpo preformado dirigido contra un antígeno del cáncer o un antígeno de la enfermedad (por ejemplo, la administración de un

25 anticuerpo monoclonal, opcionalmente ligado a un agente quimioterapéutico o toxina, para un antígeno tumoral). La inmunoterapia también puede centrarse en el uso de epitopes de líneas celulares cancerosas reconocidos por linfocitos citotóxicos. Como alternativa, se pueden usar polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos de triple hélice y otros similares para modular selectivamente biomoléculas que están vinculadas con el

inicio, el progreso y/o patología de un tumor o cáncer.

En algunas formas de realización, un agente inmunoterapéutico es un agonista de una molécula inmunoestimulante; un antagonista de una molécula inmunoinhibidora; un antagonista de una quimioquina; un agonista de una citoquina que estimula la activación de las células T; un agente que antagoniza o inhibe una citoquina que inhibe la activación de las células T; y/o un agente que se une a una proteína unida a la membrana de la familia B7. En algunas formas de realización, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de una molécula inmunoinhibidora. En algunas formas de realización, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser agentes para citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes que neutralizan el efecto inhibidor de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otros factores solubles asociados a tumores, incluyendo a IL-10, TGF- β y VEGF.

En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende inhibidores de uno o más puntos de control inmunológico. El término "punto de control inmunológico" se refiere a un grupo de moléculas en la superficie celular de las células T CD4+ y/o CD8+ que realizan un ajuste fino de las respuestas inmunológicas mediante la modulación de las respuestas inmunológicas anticancerígenas, tales como la reducción de la expresión o la inhibición de una respuesta inmunológica antitumoral. Las proteínas de puntos de control inmunológico son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD200R, CD160, gp49B, PIR-B, KRLG-1, receptores de la familia KIR, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3 (CD223), IDO, GITR, 4-1BB, OX-40, BTLA, SIRPalfa (CD47), CD48, 2B4 (CD244), B7,1, B7,2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, butirofilinas y A2aR (véase por ejemplo, WO 2012/177624). El término abarca además a fragmentos de proteínas biológicamente activos, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas de puntos de control inmunológico de longitud completa.

Algunos puntos de control inmunológico son "puntos de control inmunológico inmuno-inhibidores" que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que inhiben, reducen la expresión o suprimen una función del sistema inmunológico (por ejemplo, una respuesta inmunológica). Por ejemplo, PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), que también se conoce como CD274 o B7-H1, es una proteína que transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de células T para

inhibir el sistema inmunológico. CTLA-4 (proteína 4 asociada a células T citotóxicos), que también se conoce como CD152, es un receptor de proteína en la superficie de las células presentadoras de antígeno que sirve como un punto de control inmunológico (interruptor de "apagado") para regular negativamente las respuestas inmunológicas. TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio que contiene mucina-3), que también se conoce como HAVCR2, es una proteína de la superficie celular que sirve como un punto de control inmunológico para regular la activación de los macrófagos. VISTA (supresor de Ig de dominio V la activación de células T) es una proteína transmembrana de tipo I que funciona como un punto de control inmunológico para inhibir la función efectora de las células T y mantener la tolerancia periférica. LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) es un receptor de punto de control inmunológico que regula negativamente la proliferación, activación y homeostasis de las células T. BTLA (atenuador de linfocitos B y T) es una proteína que muestra inhibición de células T a través de interacciones con la familia de receptores de necrosis tumoral (TNF-R). KIR (receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas) es una familia de proteínas expresadas en las células NK, y una minoría de células T, que suprimen la actividad citotóxica de las células NK. En algunas formas de realización, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser agentes específicos para enzimas inmunosupresoras tales como inhibidores que pueden bloquear las actividades de la arginasa (ARG) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una proteína de punto de control inmunológico que suprime las células T y las células NK, que cambian el catabolismo de los aminoácidos arginina y triptófano en el microambiente tumoral inmunosupresor. Los inhibidores pueden incluir, pero de manera no taxativa, a: N-hidroxi-L-Arg (NOHA) dirigida hacia macrófagos M2 que expresan ARG, nitroaspirina o sildenafil (Viagra®), que bloquea simultáneamente la ARG y la óxido nítrico sintasa (NOS); e inhibidores de IDO, como 1-metil-triptófano. El término abarca además a los fragmentos de proteína biológicamente activos, así como a los ácidos nucleicos que codifican proteínas de punto de control inmunológico de longitud completa y fragmentos de proteínas biológicamente activas de las mismas. En alguna forma de realización, el término abarca además a cualquier fragmento de acuerdo con las descripciones de homología que se proveen en la presente.

Por el contrario, otros puntos de control inmunológico son "inmunoestimulantes" que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que activan, estimulan o promueven una función del

sistema inmunológico (por ejemplo, una respuesta inmunológica). En algunas formas de realización, la molécula inmunoestimulante es CD28, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), CD27, CD70, CD40, CD40L, CD122, CD226, CD30, CD30L, OX40, OX40L, HVEM, BTLA, GITR y su ligando GITRL, LIGHT, LT β R, LT $\alpha\beta$, ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2) y NKG2D. CD40 (grupo de diferenciación 40) es una proteína coestimulante que se encuentra en las células presentadoras de antígeno y que es necesaria para su activación. OX40, que también se conoce como miembro 4 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF4) o CD134, participa en el mantenimiento de una respuesta inmunológica después de la activación al prevenir la muerte de las células T y posteriormente aumentar la producción de citoquinas. CD137 es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) que coestimula las células T activadas para mejorar la proliferación y la supervivencia de las células T. CD122 es una subunidad de la proteína del receptor de interleuquina-2 (IL-2), que promueve la diferenciación de las células T inmaduras en células T regulatorias, efectoras o de memoria. El CD27 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y sirve como una molécula de punto de control inmunológico coestimulante. CD28 (grupo de diferenciación 28) es una proteína expresada en las células T que provee señales coestimulantes necesarias para la activación y supervivencia de las células T. GITR (proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides), que también se conoce como TNFRSF18 y AITR, es una proteína que desempeña un papel clave en la autotolerancia inmunológica dominante mantenida por las células T regulatorias. ICOS (coestimulante inducible de células T), que también se conoce como CD278, es una molécula coestimulante de la superfamilia CD28 que se expresa en las células T activadas y desempeña un papel en la señalización de las células T y las respuestas inmunológicas.

Los puntos de control inmunológico y sus secuencias son bien conocidos en el arte y más adelante se describen formas de realización representativas. Los puntos de control inmunológico generalmente se relacionan con pares de receptores inhibidores y los compañeros de unión naturales (por ejemplo, ligandos). Por ejemplo, los polipéptidos PD-1 son receptores inhibidores capaces de transmitir una señal inhibidora a una célula inmunológica para inhibir de esa manera la función efectora de la célula inmunológica, o son capaces de promover la coestimulación (por

ejemplo, mediante inhibición competitiva) de las células inmunológicas, por ejemplo, cuando están presentes en forma monomérica soluble. Los miembros preferidos de la familia PD-1 comparten la identidad de secuencia con PD-1 y se unen a uno o más miembros de la familia B7, por ejemplo, a los ligandos B7-1, B7-2, PD-1 y/u otros polipéptidos en células presentadoras de antígeno. El

5 término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de modular una señal inhibidora en una célula inmunológica activada, por ejemplo, acoplando un ligando PD-1 natural a una célula presentadora de antígeno. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunológica da como resultado la modulación de la proliferación y/o secreción de citoquinas por una célula inmunológica. Por lo tanto, el término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un

10 polipéptido PD-1 de unirse a su ligando o ligandos naturales, la capacidad de modular las señales inhibidoras de las células inmunológicas y la capacidad de modular la respuesta inmunológica. El término "ligando PD-1" se refiere a los compañeros de unión del receptor PD-1 e incluye tanto a PD-L1 (Freeman y col. (2000) J. Exp. Med. 192: 1027-1034) como a PD-L2 (Latchman y col. (2001) Nat. Immunol. 2: 261). El término "actividad de ligando PD-1" incluye la capacidad de un

15 polipéptido del ligando PD-1 de unirse a su receptor o receptores naturales (por ejemplo, PD-1 o B7-1), la capacidad de modular las señales inhibidoras de las células inmunológicas y la capacidad de modular la respuesta inmunológica.

Tal como se lo usa en la presente, el término "terapia de puntos de control inmunológico" se refiere al uso de agentes inhibidores que inhiben los puntos de control inmunológico, por

20 ejemplo por inhibición de sus ácidos nucleicos y/o proteínas. La inhibición de uno o más de tales puntos de control inmunológico puede bloquear o neutralizar de otra manera la señalización inhibitoria para de esa manera regular aumentando una respuesta inmunológica con el fin de tratar más eficazmente el cáncer. Algunos ejemplos de agentes útiles para inhibir puntos de control

inmunológico incluyen anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, ligandos

25 naturales y derivados de ligandos naturales, que pueden unirse y/o desactivar o inhibir proteínas de puntos de control inmunológico, o fragmentos de las mismas; así como ARN de interferencia, antisentido, aptámeros de ácido nucleico, etc. que pueden regular reduciendo la expresión y/o actividad de ácidos nucleicos de puntos de control inmunológico, o fragmentos de los mismos. Algunos ejemplos de agentes para regular una respuesta inmunológica incrementándola incluyen

anticuerpos contra una o más proteínas de puntos de control inmunológico que bloquean la interacción entre las proteínas y su receptor o receptores naturales; una forma no activante de una o más proteínas de punto de control inmunológico (por ejemplo, un polipéptido negativo dominante); moléculas pequeñas o péptidos que bloquean la interacción entre una o más proteínas de control inmunológico y su receptor o receptores naturales; proteínas de fusión (por ejemplo, la parte extracelular de una proteína inhibidora de un punto de control inmunológico fusionada con la parte Fc de un anticuerpo o inmunoglobulina) que se unen a su receptor o receptores naturales; moléculas de ácido nucleico que bloquean la transcripción o traducción de ácidos nucleicos en puntos de control inmunológico; y otros similares. Dichos agentes pueden bloquear directamente la interacción entre uno o más puntos de control inmunológico y su receptor o receptores naturales (por ejemplo, anticuerpos) para evitar la señalización inhibitoria y regular una respuesta inmunológica incrementándola. Como alternativa, los agentes pueden bloquear indirectamente la interacción entre una o más proteínas de punto de control inmunológico y su receptor o receptores naturales para evitar la señalización inhibitoria y regular una respuesta inmunológica incrementándola. Por ejemplo, una versión soluble de un ligando de proteína de punto de control inmunológico tal como un dominio extracelular estabilizado puede unirse a su receptor para reducir indirectamente la concentración eficaz del receptor para unirse a un ligando apropiado. En una forma de realización, se utilizan anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2, solos o en combinación, para inhibir los puntos de control inmunológico. Los agentes terapéuticos usados para bloquear la vía de PD-1 incluyen anticuerpos antagonistas y ligandos de PD-L1 solubles. Los agentes antagonistas contra la vía inhibitoria de PD-1 y PD-L1/2 pueden incluir, entre otros, anticuerpos antagonistas de PD-1 o PD-L1/2 (por ejemplo, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (que también se conoce como nivolumab o BMS-936558), 4A11, 7D3 y 5F4 que se describen en la Patente de Estados Unidos No. 8.008.449; AMP-224, pidilizumab (CT-011), pembrolizumab, y anticuerpos que se describen en las Patentes de EE.UU. Números 8.779.105; 8.552.154; 8.217.149; 8.168.757; 8.008.449; 7.488.802; 7.943.743; 7.635.757; y 6.808.710. De manera similar, los inhibidores de puntos de control representativos adicionales pueden ser, entre otros, anticuerpos contra el regulador inhibitorio CTLA-4 (antígeno 4 anti-linfocito T citotóxico), como ipilimumab, tremelimumab (completamente humanizado),

anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA-4, anticuerpos anti-dominio CTLA-4, fragmentos de anticuerpo anti-CTLA-4 de cadena sencilla, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena liviana y otros anticuerpos, tales como los que se describen en las Patentes de EE.UU. Números 8.748.815; 8.529.902; 8.318.916; 8.017.114; 7.744.875; 7.605.238; 7.465.446; 7.109.003; 7.132.281; 6.984.720; 6.682.736; 6.207.156; y 5.977.318, así como la patente EP. Nº 1212422, publicaciones de Patente de EE.UU. Números 2002/0039581 y 2002/086014, y Hurwitz y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95: 10067-10071.

Las definiciones representativas de actividad de punto de control inmunológico, ligando, bloqueo y otras similares ejemplificadas para PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4 son válidas en general para otros puntos de control inmunológico.

El término "terapia no direccionada" se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con una biomolécula seleccionada pero aún así tratan el cáncer. Algunos ejemplos representativos de terapias no direccionadas incluyen, sin limitación, quimioterapia, terapia génica y radioterapia.

En una forma de realización se usa quimioterapia. La quimioterapia incluye la administración de un agente quimioterapéutico. Dicho agente quimioterapéutico puede ser, de manera no taxativa, uno de aquellos que se seleccionan entre los siguientes grupos de compuestos: compuestos de platino, antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes antimitóticos, agentes alquilantes, compuestos de arsénico, inhibidores de la ADN topoisomerasa, taxanos, análogos de nucleósidos, alcaloides vegetales y toxinas; y derivados sintéticos de los mismos. Algunos ejemplos de agentes incluyen, pero de manera no taxativa, a: agentes alquilantes: mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo, estramustina y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU)), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán y treosulfán), triazenos (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida), cisplatino, treosulfán y trofosfamida; alcaloides vegetales: vinblastina, paclitaxel, docetaxol; inhibidores de la ADN topoisomerasa: tenipósido, crisnatol y mitomicina; anti-folatos: metotrexato, ácido micofenólico e hidroxiurea; análogos de pirimidina: 5-fluorouracilo, doxifluridina y citosina arabinósido, análogos de purina: mercaptopurina y tioguanina; Antimetabolitos de ADN: 2'-desoxi-5-fluorouridina, glicinato de afidicolina y pirazoloimidazol; y

agentes antimitóticos: halicondrina, colchicina y rizoxina. De manera similar, algunos ejemplos de agentes adicionales que incluyen compuestos que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), taxoides (por ejemplo, paclitaxel o un equivalente de paclitaxel tal como nanopartículas de paclitaxel unidas a albúmina (ABRAXANE), paclitaxel unido al ácido docosaheptaenoico (DHA-paclitaxel, taxoprexina), paclitaxel unido a poliglutamato (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX), el profármaco activado por tumor (TAP) ANG1005 (Angiopep-2 unido a tres moléculas de paclitaxel), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel unido al péptido EC-1 que reconoce erbB2) y paclitaxel conjugado con glucosa, por ejemplo, 2'-paclitaxel metil 2-glucopiranosil succinato; docetaxel, taxol), epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptotecin, irinotecán, crisnatol, mitomicina C), antimetabolitos, inhibidores de DHFR (por ejemplo, metotrexato, diclorometotrexato, trimetrexato, edatrexato), inhibidores de IMP deshidrogenasa (por ejemplo, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina y EICAR), inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiaurea y deferoxamina), análogos de uracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina, doxifluridina, ratitrexed, tegafur-uracilo, capecitabina), análogos de citosina (por ejemplo, citarabina (ara C) citosina arabinósido y fludarabina), análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina y tioguanina), análogos de vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093 y KH 1060), inhibidores de isoprenilación (por ejemplo, lovastatina), neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, ion 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina), actinomicina (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina), bleomicina (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina, doxorubicina liposómica pegilada, idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorrubicina, mitoxantrona), inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo), inhibidores de Ca^{2+} ATPasa (por ejemplo taspargina), imatinib, talidomida, lenalidomida, inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo, axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTINTM, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA®) (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB®, TYVERB®), lestaurtinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA®), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT®, SU11248), toceranib

(PALLADIA®) vandetanib (ZACTIMA®, ZD6474), vatalanib (PTK787, PTK/ZK), trastuzumab (HERCEPTIN®), bevacizumab (AVASTIN®), rituximab (RITUXAN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), ranibizumab (Lucentis®), nilotinib (TASIGNA®), sorafenib (NEXAVAR®), everolimus (AFINITOR®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), temsirolimus (TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, lactato de dovitinib (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647 y/o XL228), inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib (VELCADE®)), Inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD-001), ridaforolimus, AP23573 (Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis), XL765 (Sanofi Aventis), PF-4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genentech), SF1126 (Semafoe) y OSI-027 (OSI)), oblimersen, gemcitabina, carminomicina, leucovorina, pemetrexed, ciclofosfamida, dacarbazina, procarbina, prednisolona, dexametasona, campatecina, plicamicina, asparaginasa, aminopterina, metopterina, porfiromicina, melfalán, leurosina, leurosina, clorambucilo, trabectedina, procarbina, discodermolida, carminomicina, aminopterina y hexametil melamina. También se pueden usar composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP). FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. En otra forma de realización, se utilizan inhibidores de PARP (por ejemplo, PARP-1 y/o PARP-2) y dichos inhibidores son bien conocidos en el arte (por ejemplo, Olaparib, ABT-888, BSI-201, BGP-15 (N- Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34 (Soriano y col., 2001; Pacher y col., 2002b); 3-aminobenzamida (Trevigen); 4-amino-1,8-naftalimida; (Trevigen); 6(5H)-fenantridinona (Trevigen); benzamida (Patente de los EE.UU. Re. 36.397); y NU1025 (Bowman y col.). El mecanismo de acción está relacionado en general con la capacidad de los inhibidores de PARP de unirse a PARP y disminuir su actividad. PARP cataliza la conversión de dinucleótido de beta-nicotinamida y adenina (NAD⁺) a nicotinamida y poli-ADP-ribosa (PAR). Tanto la poli (ADP-ribosa) como PARP se han relacionado con la regulación de la transcripción, la proliferación celular, la estabilidad genómica y la carcinogénesis (Bouchard y col. (2003) *Exp. Hematol.* 31:

446-454); Herceg (2001) *Mut. Res.* 477: 97-110). La poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) es una molécula clave en la reparación de roturas de una sola hebra del ADN (SSB) (de Murcia J. y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7303-7307; Schreiber y col. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 517-528; Wang y col. (1997) *Genes Dev.* 11: 2347-2358). El noqueo de la función de
 5 reparación de SSB mediante la inhibición de PARP1 induce roturas de doble hebra en el ADN (DSB) que pueden desencadenar la letalidad sintética en células cancerosas con reparación de DSB dirigida por homología defectuosa (Bryant y col. (2005) *Nature* 434: 913-917; Farmer y col. (2005) *Nature* 434: 917-921). Los anteriores ejemplos de agentes quimioterapéuticos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

10 En otra forma de realización, se usa radioterapia. La radiación que se usa en la radioterapia puede ser radiación ionizante. La radioterapia también puede consistir en rayos gamma, rayos X o haces de protones. Algunos ejemplos de radioterapia incluyen, pero de manera no taxativa, radioterapia de haz externo, implantación intersticial de radioisótopos (I-125, paladio, iridio), radioisótopos como estroncio-89, radioterapia torácica, radioterapia intraperitoneal P-32, y/o
 15 radioterapia total abdominal y pélvica. Para obtener una descripción general de la radioterapia, véase Hellman, Capítulo 16: *Principles of Cancer Management: Radiation Therapy*, 6ª Edición, 2001, DeVita y col., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphia. La radioterapia se puede administrar como radiación de haz externo o teleterapia en la que la radiación se dirige desde una fuente remota. El tratamiento con radiación también se puede administrar como terapia interna o
 20 braquiterapia en la que se coloca una fuente radioactiva dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o una masa tumoral. También se incluye el uso de terapia fotodinámica que comprende la administración de fotosensibilizadores, tales como hematoporfirina y sus derivados, Vertoporfina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, desmetoxi-hipocrellina A; y 2BA-2-DMHA.

25 En otra forma de realización, se usa terapia hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales pueden comprender, por ejemplo, agonistas hormonales, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, tamoxifeno, raloxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y el procesamiento de hormonas, y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona,

prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestágenos), derivados de vitamina A (por ejemplo, ácido retinoico todo-trans (ATRA)); análogos de vitamina D3; antigestagenos (por ejemplo, mifepristona, onapristona) o antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

5 En un aspecto, en la presente se provee un método para provocar en un sujeto una respuesta inmunitaria a una célula que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. En algunas formas de realización, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica según se describe en la presente, donde al administrar al sujeto la composición farmacéutica, esta provoca una respuesta inmunitaria a la célula que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

10 En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica puede incluir una respuesta inmunológica mediada por células. Una respuesta inmunológica celular es una respuesta que involucra células T y se puede determinar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, una respuesta inmunológica celular general se puede determinar como la actividad proliferativa de células T en células (por ejemplo, leucocitos de sangre periférica (PBL)) tomadas de una muestra del sujeto en
15 un momento adecuado después de administrar una composición farmacéutica. Después de una incubación, por ejemplo, de PBMC con un estimulante por un período apropiado, se puede determinar la incorporación de [³H]timidina. El subconjunto de células T que está proliferando se puede determinar usando citometría de flujo.

 En otro aspecto abarcado por la presente invención, los métodos que se proveen en la
20 presente incluyen la administración a mamíferos humanos y no humanos según se describió anteriormente. También se contemplan aplicaciones veterinarias. En algunas formas de realización, el sujeto puede ser cualquier organismo vivo en el cual se pueda generar una respuesta inmunológica.

 En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar en
25 cualquier momento que sea apropiado. Por ejemplo, la administración se puede efectuar antes o durante el tratamiento de un sujeto que padece trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, y se continúa después de que el trastorno no maligno, trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de

un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ se vuelve clínicamente indetectable. La administración también se puede continuar en un sujeto que muestre signos de recurrencia.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar como una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz. La administración de la composición farmacéutica al sujeto se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, y a dosificaciones y durante períodos de tiempo suficientes como para lograr un efecto deseado.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto en cualquier sitio apropiado. La administración se puede lograr usando métodos generalmente conocidos en el arte. Los agentes, incluyendo a las células, pueden introducirse en el sitio deseado mediante inyección directa, o por cualquier otro medio utilizado en la técnica, incluyendo, entre otros, la administración intravascular, intracerebral, parenteral, intraperitoneal, intravenoso, epidural, intraespinal, intraesternal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraarterial, intracardiaca o intramuscular. Por ejemplo, los sujetos de interés pueden injertarse con las células trasplantadas por diversas rutas. Dichas rutas incluyen, pero de manera no taxativa, a: administración intravenosa, administración subcutánea, administración a un tejido específico (por ejemplo, trasplante focal), inyección en la cavidad de la médula ósea del fémur, inyección en el bazo, administración debajo de la cápsula renal del hígado fetal, y otras similares. En cierta forma de realización, la vacuna contra el cáncer abarcada por la presente invención se inyecta al sujeto por vía intratumoral o subcutánea. Las células se pueden administrar en una infusión o mediante infusiones sucesivas durante un período de tiempo definido suficiente para generar un efecto que se desea. Algunos ejemplos de métodos para el trasplante, la evaluación del injerto y el análisis de fenotipado de marcadores de células trasplantadas son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Pearson y col. (2008) *Curr. Protoc. Immunol.* 81:15,21,1-15,21,21, Ito y col. (2002) *Blood* 100: 3175-3182; Traggiai y col. (2004) *Science* 304: 104-107; Ishikawa y col. *Blood* (2005) 106: 1565-1573; Shultz y col. (2005) *J. Immunol.* 174: 6477-6489; y Holyoake y col. (1999) *Exp. Hematol.* 27: 1418-1427).

En algunas formas de realización, la dosis se puede administrar en una cantidad y durante un período de tiempo eficaz para producir una respuesta que se desea, ya sea suscitando la respuesta inmunológica o mediante el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno no

maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ y/o síntomas asociados con el mismo.

La composición farmacéutica se puede administrar después, antes o simultáneamente con otras terapias, que incluyen terapias que también generan una respuesta inmunológica en el sujeto. Por ejemplo, el sujeto se puede haber tratado antes o de manera concurrente con otras formas de agentes inmunomoduladores, donde dichas otras terapias se pueden proveer de manera tal que no interferirán con la inmunogenicidad de las composiciones que se describen en la presente.

La administración puede ser programada apropiadamente por el personal de salud (por ejemplo, médico, veterinario), y puede depender de la condición clínica del sujeto, los objetivos de administración y/o otras terapias que también están contempladas o administradas. En algunas formas de realización, se puede administrar una dosis inicial, y el sujeto será monitoreado por una respuesta inmunológica y/o clínica. Los medios adecuados para un monitoreo inmunológico incluyen emplear los linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente como respondedores y los péptidos inmunogénicos complejos péptido-MHC que se describen en la presente como estimulantes. Una reacción inmunológica también se puede determinar mediante una respuesta inflamatoria demorada en el sitio de la administración. Se pueden administrar una o más dosis subsiguientes a la dosis inicial según fuera apropiado, típicamente en una base mensual, semimensual o semanal, hasta lograr el efecto deseado. A continuación, se pueden administrar dosis de refuerzo o de mantenimiento adicionales según necesidad, en particular cuando parece que el beneficio inmunológico o clínico está disminuyendo.

En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proveen las moléculas o células activas en una cantidad suficiente para proveer un beneficio. Dicha respuesta se puede controlar estableciendo un mejor resultado clínico (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o más prolongada sin enfermedad) en los sujetos tratados en comparación con los sujetos no tratados. Los aumentos en las respuestas inmunológicas preexistentes a una proteína viral generalmente se correlacionan con un mejor resultado clínico. Dichas respuestas inmunológicas generalmente se pueden evaluar usando ensayos estándar de

proliferación, citotoxicidad o citoquinas, que son de rutina.

Para uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con una enfermedad o trastorno. El beneficio profiláctico de las composiciones inmunogénicas administradas de acuerdo con los métodos que se describen en la presente se puede determinar realizando estudios preclínicos (incluyendo estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* en animales) y clínicos y analizando los datos que se obtienen de los mismos mediante métodos estadísticos, biológicos y métodos y técnicas clínicos, todos los cuales pueden ser llevados a la práctica fácilmente por un especialista en la materia.

Tal como se usa en la presente, la administración de una composición se refiere a administrar la misma a un sujeto, independientemente de la ruta o el modo de administración. La administración se puede realizar de manera continua o intermitente y parenteral. La administración puede ser para tratar a un sujeto que ya se ha confirmado que tiene una afección, enfermedad o estado patológico reconocido, o para tratar a un sujeto susceptible o en riesgo de desarrollar tal afección, enfermedad o estado patológico. La coadministración con una terapia coadyuvante puede incluir la administración simultánea y/o en secuencia de múltiples agentes en cualquier orden y según cualquier calendario de dosificación (por ejemplo, células inmunológicas modificadas con una o más citoquinas; terapia inmunosupresora como inhibidores de calcineurina, corticoesteroides, inhibidores de microtúbulos, dosis bajas de un profármaco de ácido micofenólico, o cualquier combinación de los mismos).

En algunas formas de realización, se administra al sujeto una pluralidad de dosis de una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) según se describe en la presente, que se puede administrar con intervalos entre las administraciones de entre aproximadamente dos y aproximadamente cuatro semanas.

Los métodos de tratamiento o prevención que abarca la presente invención se pueden administrar a un sujeto como parte de un curso o régimen de tratamiento, que puede comprender tratamientos adicionales antes o después de la administración de las dosis unitarias, células o composiciones que se describen en la presente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un sujeto que recibe una dosis unitaria de la célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) está recibiendo o había recibido previamente un trasplante de células

hematopoyéticas (HCT, por las siglas en inglés de *Hematopoietic Cell Transplant*; incluyendo HCT mielosupresores y no mielosupresores). En cualquiera de las anteriores formas de realización, una célula hematopoyética que se utiliza en un HCT puede ser una célula de "donante universal" que se modifica para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican un producto polipeptídico seleccionado de un MHC, un antígeno y una proteína de unión (por ejemplo, mediante un noqueo cromosómico de un gen de acuerdo con los métodos que se describen en la presente).

En algunas formas de realización, las técnicas y regímenes para realizar el trasplante de células se conocen en la técnica y pueden comprender el trasplante de cualquier célula donante adecuada, tal como una célula derivada de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica, una célula madre hematopoyética, una célula madre movilizada o una célula del líquido amniótico. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) abarcada por la presente invención se puede administrar con la terapia con células madre o poco después de la misma.

En algunas formas de realización, los métodos que abarca la presente invención pueden incluir además la administración de uno o más agentes adicionales para tratar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉) mediante una terapia de combinación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar (al mismo tiempo, simultáneamente o en secuencia) la célula huésped o la proteína de unión abarcada por la presente invención con un agente antiviral. En algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar una célula huésped o proteína de unión abarcada por la presente invención con lopinavir/ritonavir, cloroquina, ribavirina, fármacos esteroides, hidroxiclороquina y/o interferón α . En algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar una célula huésped, composición o dosis unitaria de las células huésped abarcadas por la presente invención con una terapia secundaria, tal como una cirugía, un anticuerpo, una vacuna o cualquier combinación de las mismas.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano, por ejemplo un ser humano

con un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor, por ejemplo un ratón. En algunas formas de realización con dichas características, el ratón es un ratón transgénico, por ejemplo un ratón que expresa moléculas del MHC (es decir, HLA) humanas, tales como HLA-A2 (por ejemplo, Nicholson y colab. (2012) Adv. Hematol. 2012:404081).

En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humanos o es un ratón negativo para el antígeno (por ejemplo, Li y colab. (2010) Nat. Med. 16:1029-1034 y Obenaus y colab. (2015) Nat. Biotechnol 33:402-407). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas del HLA humano y TCR humanos.

En algunas formas de realización, por ejemplo cuando el sujeto es un ratón HLA transgénico, los TCR identificados se modifican, por ejemplo, para que sean quiméricos o humanizados. En algunas formas de realización, el andamiaje del TCR se modifica de manera análoga a los métodos conocidos de humanización de proteínas de unión.

c. Métodos de selección

Otro aspecto que abarca la presente invención abarca los ensayos de cribado o selección.

La presente invención abarca ensayos para agentes de selección, tales como proteínas de prueba, que se unen a HPV16 E7₁₁₋₁₉ o a un antígeno del mismo o modulan su actividad. Dichos agentes incluyen, de manera no taxativa, anticuerpos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, un método para identificar un agente que modula una respuesta inmunitaria incluye determinar la capacidad del agente candidato de modular la actividad de HPV16 E7₁₁₋₁₉ y modular adicionalmente una respuesta inmunitaria de interés, tal como la activación y/o actividad de células T citotóxicas moduladas, la sensibilidad de células cancerosas a la terapia de punto de control inmunitario, y otros similares.

En algunas formas de realización, el ensayo es un ensayo libre de células o un ensayo basado en células, que comprende poner en contacto a una diana con un agente de prueba y determinar la capacidad del agente de prueba de modular (por ejemplo, aumentando o

disminuyendo la expresión) la cantidad y/o la actividad de la diana, por ejemplo midiendo parámetros directos o indirectos según se describe a continuación.

En algunas formas de realización, el ensayo es un ensayo basado en células, por ejemplo uno que comprende poner en contacto (a) una célula de interés con un agente de prueba y
5 determinar la capacidad del agente de prueba de modular la cantidad y/o la actividad de la diana, por ejemplo sus características de unión. La determinación de la capacidad de los polipéptidos de unirse o interactuar entre sí se puede realizar, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un parámetro de activación de las células inmunitarias o una función de las mismas.

En otra forma de realización, el ensayo es un ensayo basado en células, que comprende
10 poner en contacto una célula tal como una célula cancerosa con células inmunitarias (por ejemplo, células T citotóxicas) y un agente de prueba, y determinar la capacidad del agente de prueba de modular la cantidad y/o actividad de la diana, y/o respuestas inmunitarias moduladas, por ejemplo, midiendo parámetros directos o indirectos según se describe más adelante.

Los métodos descritos anteriormente y en la presente también se pueden adaptar para
15 probar uno o más agentes que ya se sabe que modulan la cantidad y/o la actividad de uno o más biomarcadores que se describen en la presente para confirmar la modulación de uno o más biomarcadores y/o para confirmar la efectos de los agentes sobre las lecturas de un fenotipo deseado, tales como respuestas inmunitarias moduladas, sensibilidad al bloqueo del punto de control inmunitario y otros similares.

En algunas formas de realización, la determinación de la capacidad de un agente de
20 prueba (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) de modular la interacción entre un determinado conjunto de polipéptidos se puede realizar determinando la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de una proteína y/o uno o más compañeros de unión se puede determinar detectando la
25 inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, señalización intracelular), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informante (que comprende un elemento regulador que responde a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por la proteína y/o uno o más

compañeros de unión. La determinación de la capacidad del agente de prueba de unirse o interactuar con dicho polipéptido se puede lograr, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto de modular la coestimulación o inhibición de células inmunológicas en un ensayo de proliferación, o interfiriendo con la capacidad de dicho polipéptido de unirse a anticuerpos que reconocen una parte de los mismos.

Los agentes que modulan la cantidad y/o la actividad de la diana, tales como las interacciones con uno o más compañeros de unión, se pueden identificar por su capacidad de inhibir la proliferación de células inmunológicas y/o la función efectora, o de inducir anergia, supresión clonal y/o agotamiento cuando se agregan a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en presencia de un agente que estimule la transducción de señales a través de un receptor activador. Se pueden emplear varias lecturas reconocidas de activación celular para medir la proliferación celular o la función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citoquinas, fagocitosis) en presencia del agente. La capacidad de un agente de prueba de bloquear esta activación se puede determinar fácilmente midiendo la capacidad del agente de efectuar una disminución en la proliferación o la función efectora que se mide, usando técnicas conocidas en el arte.

Por ejemplo, los agentes que abarca la presente invención se pueden probar para determinar la capacidad de inhibir o mejorar la coestimulación en un ensayo de células T, según se describe en Freeman y col. (2000) J. Exp. Med. 192: 1027 y Latchman y col. (2001) Nat. Immunol. 2: 261. Las células T CD4⁺ se pueden aislar de PBMC humanas y se pueden estimular con un anticuerpo anti-CD3 activador. La proliferación de células T se puede medir mediante la incorporación de timidina ³H. Se puede realizar un ensayo con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Se pueden realizar ensayos similares con células T Jurkat y PHA-blastos de PBMC.

Como alternativa, los agentes que abarca la presente invención se pueden probar para determinar la capacidad de modular la producción celular de citoquinas que son producidas por células inmunológicas o cuya producción se potencia o inhibe en las mismas, en respuesta a la modulación de uno o más biomarcadores. Las citoquinas indicativas liberadas por las células inmunológicas de interés se pueden identificar mediante ELISA o por la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citoquina de inhibir la proliferación de células inmunológicas o la

proliferación de otros tipos de células inducida por la citoquina, según se describe en la sección de Ejemplos. También se puede usar un ensayo de coestimulación de células inmunológicas *in vitro* en un método para identificar citoquinas que se pueden modular mediante la modulación de uno o más biomarcadores. Por ejemplo, si una actividad particular inducida por la coestimulación, por ejemplo, la proliferación de células inmunológicas, no puede inhibirse mediante el agregado de anticuerpos bloqueadores a citoquinas conocidas, la actividad puede ser el resultado de la acción de una citoquina desconocida. Después de la coestimulación, esta citoquina se puede purificar del medio mediante métodos convencionales y su actividad se puede medir por su capacidad de inducir la proliferación de células inmunológicas. Para identificar las citoquinas que pueden desempeñar un papel en la inducción de tolerancia, se puede usar un ensayo de coestimulación de células T *in vitro* según se describió anteriormente. En este caso, las células T recibirían la señal de activación primaria y se pondrían en contacto con una citoquina seleccionada, pero no recibirían la señal coestimulante. Después de lavar y dejar en reposo las células inmunológicas, las células se volverán a exponer tanto a una señal de activación primaria como a una señal coestimulante. Si las células inmunológicas no responden (por ejemplo, si proliferan o producen citoquinas), se han tolerizado y la citoquina no ha impedido la inducción de tolerancia. Sin embargo, si las células inmunológicas responden, la citoquina ha impedido la inducción de tolerancia. Aquellas citoquinas que son capaces de prevenir la inducción de tolerancia se pueden dirigir para realizar un bloqueo *in vivo* junto con reactivos que bloquean antígenos de linfocitos B como un medio más eficaz de inducir tolerancia en receptores de trasplantes o sujetos con enfermedades autoinmunes.

En algunas formas de realización, un ensayo abarcado por la presente invención es un ensayo libre de células para la selección de agentes que modulan la interacción entre un biomarcador y/o uno o más compañeros de unión, que comprende poner en contacto un polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o una parte biológicamente activa de los mismos, con un agente de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba de modular la interacción entre el polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o una parte biológicamente activa de los mismos. La unión del compuesto de prueba se puede determinar directa o indirectamente según se describió anteriormente. En una forma de realización, el ensayo

incluye poner en contacto al polipéptido, o una parte biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto a la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del agente de ensayo de interactuar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, donde la determinación de la capacidad del agente de prueba de interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del agente de prueba de unirse preferentemente al polipéptido o a una parte biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.

En algunas formas de realización, ya sea para ensayos basados en células o libres de células, se puede analizar un agente de prueba para determinar si afecta la unión y/o la actividad de la interacción entre el polipéptido y uno o más compañeros de unión, con otros compañeros de unión.. Otros métodos de análisis de unión útiles incluyen el uso de Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander y Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345 y Szabo y otros (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705). Tal como se usa en la presente, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, Biacore®). Se pueden usar los cambios en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR) como una indicación de las reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. Los polipéptidos de interés se pueden inmovilizar en un chip Biacore® y se pueden probar múltiples agentes (anticuerpos de bloqueo, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) para determinar la unión al polipéptido de interés. Un ejemplo del uso de la tecnología BIA se describe en Fitz y col. (1997) *Oncogene* 15: 613.

Los ensayos libres de células que abarca la presente invención son apropiados para usar formas de proteínas tanto solubles como unidas a membranas. En el caso de ensayos libres de células en los que se usa una proteína en la forma unida a membrana, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana de la proteína se mantenga en solución. Algunos ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoli(éter de etilenglicol)_n, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-

3-amonio-1-propano sulfonato.

En una o más formas de realización de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar cualquiera de los polipéptidos para facilitar la separación de las formas complejadas de las no complejadas de una o ambas proteínas, así como para adaptar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido se puede lograr en cualquier recipiente apropiado para contener los reactivos. Algunos ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una forma de realización, se puede proveer una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, se pueden adsorber proteínas de fusión de polipéptidos a base de glutatión-S-transferasa, o las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/diana, sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de salinidad y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, en el caso de las perlas la matriz se inmoviliza, y el complejo se determina directa o indirectamente, por ejemplo, según se describió anteriormente. Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz y se puede determinar el nivel de unión o actividad de polipéptido usando técnicas estándar.

La presente invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de selección descritos anteriormente. Por lo tanto, el uso adicional de un agente identificado según se describe en la presente en un sistema modelo apropiado se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un agente identificado según se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Como alternativa, un agente identificado según se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, la presente invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente para tratamientos según se describe en la presente.

d. Monitoreo de los efectos durante los ensayos clínicos

El monitoreo de la influencia de la terapia (por ejemplo, compuestos, fármacos, vacunas, terapias celulares y similares) de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ sobre respuestas inmunitarias, tales como la reactividad de las células T (por ejemplo, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora), se puede aplicar no solo en la detección de moléculas de unión al antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ candidatas básicas, sino también en estudios clínicos. Por ejemplo, la eficacia de unión de las proteínas y composiciones relacionadas que se describen en la presente, por ejemplo ácidos nucleicos, células huésped, formulaciones farmacéuticas y similares, para aumentar la respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria de las células T) contra células de interés, por ejemplo células hiperproliferativas, que expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, se puede controlar en ensayos clínicos realizados en sujetos afectados por un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. En dichos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación de células T, destrucción y/o liberación de citoquinas), se puede usar como una "lectura" o marcador del fenotipo de una célula, tejido o sistema en particular. De manera similar, la eficacia de una terapia de células T adaptativa con células T modificadas para que expresen una proteína de unión (por ejemplo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un CAR o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector) según se describe en la presente para aumentar la respuesta inmunitaria a las células de interés, tales como las células hiperproliferativas, que expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, se puede controlar en ensayos clínicos realizados en sujetos que padecen un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. En dichos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación, muerte o liberación de citoquinas de células T) se puede usar como una "lectura" o marcador del fenotipo de un determinada célula, tejido o sistema.

Por ejemplo, puede ser deseable aumentar la administración de la terapia contra el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída del trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ para aumentar la presencia en una

muestra obtenida del sujeto o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y una o más proteínas de unión o composición relacionada, por ejemplo para aumentar la eficacia de la terapia contra el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída del trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. De acuerdo con una forma de realización con esas características, la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y una o más proteínas de unión o composición relacionada se puede usar como un indicador de la efectividad de una terapia contra un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o un recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable. De manera similar, el análisis de la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y una o más proteínas de unión o una composición relacionada, por ejemplo mediante un ensayo de unión directa, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular, también se pueden usar para seleccionar pacientes que recibirán la terapia contra el trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída del trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉.

Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, los péptidos inmunogénicos o los complejos de péptido antígeno-MHC (pMHC) se pueden acoplar con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que se pueda determinar la unión detectando los péptidos inmunogénicos marcados o los complejos pMHC. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos o los complejos pMHC se pueden marcar con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³H, ya sea directa o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar por recuento directo de la radioemisión o por recuento del centelleo. Como alternativa, los péptidos inmunogénicos o los complejos pMHC se pueden marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la marcación enzimática se puede detectar determinando la conversión de un sustrato apropiado en producto. La determinación de la interacción entre péptidos inmunogénicos o complejos pMHC y células inmunitarias, tales como las células T y/o células NK, también se puede realizar utilizando ensayos de análisis enzimático o de unión estándar. En una o más formas de realización de los

métodos de ensayo descritos precedentemente, para adaptarse a la automatización del ensayo puede ser deseable inmovilizar péptidos inmunogénicos o complejos pMHC.

El alcance de la presente invención también abarca la determinación de la capacidad de un agente de modular un parámetro de interés sin marcar de ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, para detectar la interacción entre polipéptidos sin necesidad de marcar los polipéptidos a controlar, se puede usar un microfisiómetro (McConnell y colab. (1992) Science 257:1906-1912). Tal como se lo usa en la presente, un "microfisiómetro" (por ejemplo, un instrumento Cytosensor®) es un instrumento analítico que mide la velocidad con que una célula acidifica su ambiente usando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

La unión de péptidos inmunogénicos o complejos pMHC a células inmunitarias, tales como células T y/o células NK, se puede realizar en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Algunos ejemplos no limitativos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Las formas inmovilizadas de los péptidos inmunogénicos o complejos pMHC también pueden incluir péptidos inmunogénicos o complejos pMHC unidos a una fase sólida tal como un material poroso, microporoso (con un diámetro de poro promedio inferior a aproximadamente un micrón) o macroporoso (con un diámetro de poro promedio mayor de aproximadamente 10 micrones), por ejemplo una membrana, celulosa, nitrocelulosa o fibras de vidrio; una esfera, como las de agarosa o poliacrilamida o látex; o una superficie de una placa, un plato o pocillo, por ejemplo hechos de poliestireno.

En algunas formas de realización, la reactividad de una muestra obtenida del sujeto con una o más proteínas de unión o con una o más células huésped según se describen en la presente se puede medir detectando la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora. El término "activación de células T" se refiere a células T seleccionadas en base a proliferación, diferenciación, secreción de citoquinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación, y se refiere particularmente a una o más respuestas celulares de linfocitos T citotóxicos.

La producción y/o liberación de citoquinas se puede medir empleando métodos bien

conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT), ensayo Luminex®, tinción de citoquinas intracelulares y citometría de flujo, y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción de citoquinas intracelulares y citometría de flujo). La determinación de dicho parámetro dependerá del método que se implemente.

5 Tal como se lo usa en la presente, el término "citoquina" se refiere a una molécula que media y/o regula una función o proceso biológico o celular (por ejemplo, inmunidad, inflamación y hematopoyesis). Tal como se lo usa en la presente, el término "citoquina" incluye a "linfocinas", "quimioquinas", "monoquinas" e "interleucinas". Algunos ejemplos de citoquinas útiles son: GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- β , IFN- γ ,
10 MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α , y TNF- β .

La proliferación y expansión clonal de células T resultantes de la inducción o estimulación específica del antígeno de una respuesta inmunitaria se puede determinar, por ejemplo, mediante la incorporación de un ensayo no radioactivo, por ejemplo un ensayo de timidina tritiada o un ensayo de MTT.

15 Los ensayos de citotoxicidad para determinar la actividad de los CTL se pueden realizar utilizando cualquiera de varias técnicas y métodos que se practican habitualmente en la técnica (por ejemplo, Henkart y colab. (2003) Fund. Immunol. 1127-1150). Se puede encontrar una descripción adicional de métodos para medir la reactividad de células T específicas de antígeno, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. Nº 10.208.086 y en la Publ. de Patente de los EE.UU. Nº
20 2017/0209573.

e. Medicina Predictiva

La presente invención también se relaciona con el campo de la medicina predictiva en el que se utilizan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico y ensayos clínicos de seguimiento
25 con fines de pronóstico (predictivos) para tratar profilácticamente a un individuo. Por lo tanto, un aspecto que abarca la presente invención abarca ensayos de diagnóstico para determinar (por ejemplo, detectar) la presencia, ausencia, cantidad y/o nivel de actividad de HPV16 E7₁₁₋₁₉ o reactividad a HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, de sangre, suero, células o tejido) para determinar de esta manera si es probable que un individuo afectado

por un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ responda a la terapia, ya sea en un estado original o como recurrencia. Dichos ensayos se pueden utilizar con fines de pronóstico o predictivos para tratar profilácticamente a un individuo antes del inicio o después de la recurrencia de un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉.

5 Los métodos de diagnóstico que se describen en la presente se pueden utilizar también para identificar sujetos que padecen un trastorno asociado con la expresión o falta de expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ o están en riesgo de desarrollarlo. Tal como se lo usa en la presente, el término "aberrante" incluye el aumento o la disminución de la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ desde los niveles normales. La expresión o actividad aberrante incluye la expresión o actividad aumentada o
10 disminuida, así como una expresión o actividad que no sigue el patrón de desarrollo normal de la expresión o el patrón de expresión subcelular. Por ejemplo, es la intención que los niveles aberrantes incluyan los casos en los que una mutación en el gen del biomarcador o la secuencia reguladora, o la amplificación del gen cromosómico, provoca el aumento o la disminución de la expresión del biomarcador de interés. Tal como se lo usa en la presente, el término "no deseado" incluye a un fenómeno no deseado relacionado con una respuesta biológica, tal como la actividad
15 de las células inmunitarias.

Los ensayos que se describen en la presente, por ejemplo los anteriores ensayos de diagnóstico o los ensayos siguientes, se pueden utilizar para identificar a un sujeto que padece un trastorno asociado con la regulación defectuosa de HPV16 E7₁₁₋₁₉ o está en riesgo de
20 desarrollarlo. Por lo tanto, la presente invención provee un método para identificar un trastorno asociado con la regulación aberrante o no deseada de HPV16 E7₁₁₋₁₉ en el que se obtiene una muestra de prueba de un sujeto y se detecta la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, donde la presencia de la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉ es diagnóstico de que el sujeto padece el trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de HPV16 E7₁₁₋₁₉ o está en riesgo de desarrollarlo. Tal como se
25 lo usa en la presente, una "muestra de prueba" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un fluido biológico (por ejemplo, fluido cerebroespinal o suero), una muestra celular o un tejido, por ejemplo un portaobjetos histopatológico del microambiente tumoral, el área peritumoral y/o el área intratumoral.

Además, los ensayos de pronóstico que se describen en la presente se pueden utilizar

para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente que se describe en la presente para tratar dicho trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de HPV16 E7₁₁₋₁₉. Por ejemplo, dichos métodos se pueden utilizar para determinar si un sujeto se puede tratar de manera efectiva con un agente o con una combinación de agentes. Por lo tanto, la presente invención provee métodos para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con uno o más agentes de los que se describen en la presente para tratar un trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de HPV16 E7₁₁₋₁₉.

Los métodos que se describen en la presente se pueden realizar, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico preempaquetados que comprenden por lo menos un reactivo de anticuerpo que se describe en la presente, que se puede utilizar convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que presentan síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad que incluye el biomarcador de interés.

Además, en los ensayos de pronóstico que se describen en la presente se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido en el que se exprese el biomarcador de interés.

Además, los métodos de pronóstico que se describen en la presente se pueden usar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente terapéutico para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉.

f. Eficacia clínica

La eficacia clínica se puede medir empleando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la respuesta a una terapia se relaciona con cualquier respuesta del trastorno caracterizado por la expresión de HPV16 E7₁₁₋₁₉, por ejemplo, un tumor, a la terapia, preferiblemente un cambio en el número de células cancerosas, masa tumoral y/o volumen del tumor, por ejemplo después del inicio de la quimioterapia neoadyuvante o coadyuvante. La respuesta del tumor se puede evaluar en una situación neoadyuvante o coadyuvante en la que se puede comparar el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica con el tamaño y las dimensiones iniciales medidos por TC, PET, mamografía, ecografía o palpación y se puede estimar histológicamente la celularidad de un tumor y compararla con la celularidad de una biopsia tumoral tomada antes de iniciar el tratamiento. La respuesta también se puede evaluar por

medición con calibre o examen patológico del tumor después de una biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de forma cuantitativa, como el cambio porcentual en el volumen del tumor o la celularidad, o mediante el uso de un sistema de puntaje semicuantitativo, como la carga residual de cáncer (Symmans y colab. (2007) J. Clin. Oncol. 25: 4414-4422) o
 5 puntaje de Miller-Payne (Ogston y colab. (2003) Breast (Edinburgo, Escocia) 12:320-327) de manera cualitativa como “respuesta patológica completa” (pCR), “remisión clínica completa” (cCR), “remisión clínica parcial” (cPR), “enfermedad clínica estable” (cSD), “enfermedad clínica progresiva” (cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta del tumor se puede realizar poco después del inicio de la terapia neoadyuvante o coadyuvante (por ejemplo, después
 10 de algunas horas, días, semanas o, preferiblemente, después de algunos meses). Un criterio de valoración típico para la evaluación de la respuesta es la terminación de la quimioterapia neoadyuvante o la extirpación quirúrgica de las células tumorales residuales y/o el lecho tumoral. En la anterior Sección I se provee orientación adicional sobre las definiciones de los términos que se mencionan.

15

VII. Terapia celular

En otro aspecto abarcado por la presente invención, se administran a sujetos los métodos incluyen la terapia celular adoptiva, mediante la cual las células modificadas que expresan las moléculas provistas dirigidas a un epítopo restringido por MHC (por ejemplo, células que expresan
 20 una proteína de unión (por ejemplo, un TCR o CAR) o que se unen a un fragmento de unión al antígeno del mismo). Dicha administración puede promover la activación de células inmunológicas (por ejemplo, la activación de células T) de una manera dirigida hacia el antígeno, de manera que se dirijan hacia las células de interés, tales como las células hiperproliferativas, que expresan un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉ para destruirlas.

25

Por consiguiente, los métodos y usos provistos incluyen métodos y usos para una terapia celular adoptiva. En algunas formas de realización, los métodos incluyen la administración de células o de una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, tal como una que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene la enfermedad, condición o trastorno. En algunas formas de realización, las células, poblaciones y composiciones se administran a un

sujeto que padece la enfermedad o condición particular a tratar, (por ejemplo, mediante terapia adoptiva de células T). En algunas formas de realización, las células o composiciones se administran al sujeto, tal como un sujeto que padece o que tiene el riesgo de padecer la enfermedad o condición. En algunas formas de realización, los métodos permiten entonces tratar, por ejemplo, aliviar, uno o más síntomas de la enfermedad o condición.

Los métodos de administración de células para una terapia celular adoptiva son conocidos y se pueden usar con relación a los métodos y las composiciones provistas (por ejemplo, la Patente de EE.UU. Publ. No. 2003/0170238, Patente de EE.UU. N° 4.690.915, Rosenberg (2011) Nat. Rev. Clin. Oncol. 8: 577-585, Themeli y col. (2013) Nat. Biotechnol. 31: 928-933, Tsukahara y col. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438:84-89, y Davila y col. (2013) *PLoS ONE* 8:e61338).

En algunas formas de realización, la terapia celular (por ejemplo, la terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva con células T) se puede llevar a cabo mediante transferencia autóloga, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir del sujeto que recibirá la terapia celular, o a partir de una muestra derivada de dicho sujeto. Por lo tanto, en algunas formas de realización, las células derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente que necesita un tratamiento, y las células, se administran al mismo sujeto después de su aislamiento y procesamiento.

En algunas formas de realización, la terapia celular (por ejemplo, una terapia celular adoptiva, tal como una terapia celular T adoptiva) se puede llevar a cabo mediante transferencia alogénica, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir de un sujeto distinto del sujeto que recibirá o que finalmente recibirá la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En dichas formas de realización, las células se administran luego a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunas formas de realización, el primer y segundo sujetos son genéticamente idénticos (singénicos). En algunas formas de realización, el primer y segundo sujetos son genéticamente similares. En algunas formas de realización, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo HLA que el primer sujeto.

En algunas formas de realización, el sujeto, a quien se administrarán las células, poblaciones de células o composiciones, es un primate, tal como un ser humano. En algunas

formas de realización, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser de sexo masculino o femenino y puede ser de cualquier edad adecuada, incluyendo niños, niños jóvenes, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor. En algunos ejemplos, el paciente o sujeto es un modelo animal validado para la enfermedad, terapia celular adoptiva y/o de evaluación de resultados tóxicos tal como el síndrome de liberación de citoquinas (CRS).

Las moléculas de unión, como los TCR, los fragmentos de unión al antígeno de los TCR (por ejemplo, scTCR) y los receptores quiméricos (por ejemplo, CAR) que contienen el TCR, y células que expresan los mismos, se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretinal, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracámaras, inyección subconjuntiva, inyección subconjuntiva, inyección sub-Tenon, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtaescleral posterior. En algunas formas de realización, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se deseara, un tratamiento local, una administración intralesión. Las infusiones parenterales incluyen una administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación y administración pueden depender en parte de si la administración es breve o crónica. Los diversos esquemas de dosificación incluyen, pero en un sentido no taxativo, administraciones individuales o múltiples en varios puntos de tiempo, administración en bolo e infusión por pulsos.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de la molécula de unión o célula dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de molécula de unión, la severidad y el curso de la enfermedad, de si la molécula de unión se administra con fines preventivos o terapéuticos, de una terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la molécula de unión, y la discreción del médico de cabecera. Las composiciones y moléculas y células se administran al paciente convenientemente, en algunas formas de realización, de una vez o mediante una serie de tratamientos.

En algunas formas de realización, las células se pueden administrar a $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $0,6 \times 10^6$, $0,7 \times 10^6$, $0,8 \times 10^6$, $0,9 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $1,0 \times$

10^7 , $5,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $5,0 \times 10^8$, o más, células por kilogramo de peso corporal del sujeto o cualquier rango entre dichos valores o cualquier valor intermedio. El número de células trasplantadas puede ajustarse en función del nivel de injerto que se desea en un período de tiempo determinado. Generalmente, se pueden trasplantar entre 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 células/kg de peso corporal, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 células/kg de peso corporal, o aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal, o más células, según sea necesario. En alguna forma de realización, es eficaz el trasplante de por lo menos aproximadamente $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$, o $5,0 \times 10^6$ células totales con relación a un ratón de tamaño medio. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se pueden administrar células o poblaciones individuales de subtipos de células al sujeto en un rango de entre aproximadamente un millón y aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, entre 1 millón y aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como entre aproximadamente 10 millones y aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), y en algunos casos entre aproximadamente 100 millones de células y aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células,

aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor comprendido en estos rangos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosificaciones pueden variar dependiendo de características particulares de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/u de otros tratamientos.

El injerto de células trasplantadas se puede evaluar mediante cualquiera de diversos métodos, tales como, entre otros, el volumen del tumor, los niveles de citoquinas, el momento de la administración, el análisis por citometría de flujo de las células de interés obtenidas del sujeto en uno o más puntos de tiempo después del trasplante, y parámetros similares. Por ejemplo, un análisis basado en el tiempo de espera 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 días puede indicar el momento de la extracción del tumor. Cualquiera de estas medidas son variables que pueden ajustarse de acuerdo con parámetros bien conocidos para determinar el efecto de la variable en una respuesta a la inmunoterapia contra el cáncer. Además, las células trasplantadas pueden cotrasplantarse con otros agentes, tales como citoquinas, matrices extracelulares, soportes de cultivo celular y otros similares.

Las células también se pueden administrar antes, al mismo tiempo o después de otros agentes anticancerígenos.

Se pueden combinar y administrar dos o más tipos de células, por ejemplo en una terapia basada en células y transferencia celular adoptiva de células madre, vacunas contra el cáncer y terapia basada en células, y otras similares. Por ejemplo, las inmunoterapias adoptivas basadas en células se pueden combinar con las terapias basadas en células abarcadas por la presente invención. En algunas formas de realización, los agentes basados en células se pueden usar solos o en combinación con agentes adicionales basados en células, tales como inmunoterapias como la terapia adoptiva de células T (ACT). Por ejemplo, células T modificadas para reconocer el CD19 que se usan para tratar el linfoma folicular de células B. Las células inmunológicas para ACT pueden ser células dendríticas, células T tales como células T CD8⁺ y células T CD4⁺, células asesinas naturales (NK), células T NK, células T citotóxicos (CTL), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células asesinas activadas por linfoquinas (LAK), células T de memoria, células T regulatorias (Tregs), células T auxiliares, células asesinas inducidas por citoquinas (CIK) y

cualquier combinación de las mismas. Algunas modalidades inmunoterapéuticas basadas en células adoptivas bien conocidas incluyen, sin limitación, células tumorales autólogas o alogénicas irradiadas, lisados tumorales o células tumorales apoptóticas, inmunoterapia basada en células presentadoras de antígenos, inmunoterapia basada en células dendríticas, transferencia de células T adoptivas, terapia adoptiva de células T con CAR, terapia de mejora inmunológica autóloga (ALET), vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos. Dichas inmunoterapias basadas en células se pueden modificar adicionalmente para expresar uno o más productos génicos para modular aún más las respuestas inmunológicas, por ejemplo la expresión de citoquinas como GM-CSF y/o para expresar antígenos de antígenos asociados a tumores (TAA), como Mage-1, gp-100 y otros similares. La relación de un agente abarcado por la presente invención, tal como las células cancerosas, a otro agente abarcado por la presente invención u otra composición puede ser 1:1 entre sí (por ejemplo, cantidades iguales de 2 agentes, 3 agentes, 4 agentes, etc.), pero se puede modular en cualquier cantidad que se desee (por ejemplo, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1, 7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, 10:1 o mayor).

En algunas formas de realización, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, la dosis incluye menos de aproximadamente 1×10^8 células que expresan la proteína de unión total (por ejemplo, TCR o CAR), células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, en el rango de entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^8 de dichas células, tal como 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 o 1×10^8 o todas dichas células, o en un rango entre cualesquiera dos de los valores precedentes.

En algunas formas de realización, las células o composiciones relacionadas que se describen en la presente, tales como ácidos nucleicos, células huésped, formulaciones farmacéuticas y otras similares se pueden administrar como parte de un tratamiento combinado, tal como simultáneamente o en secuencia, en cualquier orden, con otra intervención terapéutica, tal como otro anticuerpo o célula modificada o receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico.

En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra

intervención terapéutica, ya sea de manera simultánea o en secuencia en cualquier orden. En algunos contextos, las células o la composición relacionada se coadministran con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones de células mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada se administran antes de los uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada se administran después de los uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En algunas formas de realización, la actividad biológica de las células o la composición relacionada se mide mediante cualquiera de diversos métodos conocidos una vez que las células o la composición relacionada se administran a un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o modificada u otra célula inmunológica al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante imágenes, o *in vitro/ex vivo*, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En algunas formas de realización, la capacidad de las células de destruir células diana (citotoxicidad) se puede medir usando cualquier ensayo o método apropiado conocido en el arte (por ejemplo, Kochenderfer y col. (2009) *J. Immunother.* 32: 689-702 y Herman y col. (2004) *J. Immunol. Meth.* 285: 25-40). En algunas formas de realización, también se puede medir la actividad biológica de las células ensayando la expresión y/o secreción de ciertas citoquinas, tales como CD107a, IFN γ , IL-2 y TNF alfa. En algunas formas de realización, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, por ejemplo la reducción de la carga viral.

En algunas formas de realización, las células se modifican de diversas maneras, de manera de incrementar su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, la proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR o un fragmento de unión al antígeno modificado) expresada por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un conector a una unidad de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos con unidades de direccionamiento es bien conocida en la técnica (por ejemplo, Wadwa y col. (1995) *J. Drug Targeting* 3: 111 y Patente de EE.UU. Nº 5.087.616).

Las células inmunológicas, como los linfocitos citotóxicos, se pueden obtener de cualquier fuente adecuada, como sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. Las células inmunológicas se

pueden usar como preparaciones crudas o como preparaciones parcialmente purificadas o sustancialmente purificadas, que se pueden obtener mediante técnicas estándar que incluyen, pero en un sentido no taxativo, métodos que involucran técnicas inmunomagnéticas o de citometría de flujo usando anticuerpos

5 En otro aspecto que abarca la presente invención, aquí se provee un método para provocar una respuesta inmunitaria a una célula que expresa un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, donde el método comprende administrar al sujeto las células que se describen en la presente, que expresan una proteína de unión (por ejemplo TCR, CAR o fragmento de unión a antígeno del mismo) en cantidades efectivas suficientes para provocar la respuesta inmunitaria. En algunas
10 formas de realización, en la presente se provee un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células que se describen en la presente, que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR o fragmento de unión a antígeno de los
15 mismos modificados por ingeniería genética). En una forma de realización, las células se administran sistémicamente, por ejemplo por inyección. Como alternativa, se pueden administrar localmente en lugar de hacerlo sistémicamente, por ejemplo, mediante una inyección directamente en el tejido, por ejemplo en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

 En algunas formas de realización, las células que se describen en la presente que
20 expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR o fragmento de unión a antígeno de los mismos) se pueden usar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno HPV16 E7₁₁₋₁₉. En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno cebadas
25 con HPV16 E7₁₁₋₁₉ se pueden usar para generar linfocitos (por ejemplo, células T CD8+, células T CD4+ y/o linfocitos B), para uso adicional en la transferencia adoptiva al sujeto con la células que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR modificados por ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno de los mismos).

 En algunas formas de realización, las células que se describen en la presente que

expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR modificados por ingeniería genética o fragmentos de unión a antígeno), ya sea solas o en combinación con los linfocitos, se pueden administrar a un sujeto para provocar una respuesta inmunitaria, en particular para provocar una respuesta inmunitaria a las células que expresan un antígeno HPV16 E7¹¹⁻¹⁹.

5 Según se describió anteriormente, las administraciones únicas o múltiples de las células que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión al antígeno de los mismos), ya sea solas o en combinación con los linfocitos, se pueden llevar a cabo con cantidades de células y tratamientos seleccionados por el proveedor de atención (por ejemplo, un médico). De manera similar, las
10 células, solas o en combinación con linfocitos, se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados pueden comprender el medio de crecimiento en el cual se cultivaron las células, o cualquier medio de amortiguación adecuado tal como solución amortiguadora salina con fosfato. Las células se pueden administrar solas o como una terapia adjunta junto con otros agentes terapéuticos.

15

VIII. Kits y Dispositivos

La presente invención también abarca kits y dispositivos. Por ejemplo, el kit o dispositivo puede comprender proteínas de unión, ácidos nucleicos o vectores que comprenden secuencias que codifican proteínas de unión, células huésped que comprenden ácidos nucleicos o vectores
20 y/o que expresan las proteínas de unión según se describen en la presente, complejos de péptido-MHC estables, coadyuvantes, reactivos de detección y combinaciones de los mismos, envasados en un recipiente apropiado y pueden comprender además instrucciones para usar dichos reactivos. El kit o dispositivo también puede contener otros componentes, tales como herramientas de administración en un envase separado. El kit o dispositivo se puede proveer,
25 distribuir o vender como una unidad para realizar los métodos que abarca la presente invención

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos para el Ejemplo 2

a. Empaquetado lentiviral y cuantificación del título lentiviral

Se utilizó Lenti-X™ GoStix™ Plus (Takara Bio USA, Mountain View, CA) para empaquetar y cuantificar construcciones virales HPV16-E7₁₁₋₁₉. En resumen, las construcciones virales HPV16-E7₁₁₋₁₉ se diluyeron 1:100 con PBS. Se aplicaron veinte (20) ul de sobrenadante viral de HPV16-E7₁₁₋₁₉ al pocillo de muestra del casete Lenti-X™ GoStix™ Plus y luego se aplicaron 80 ul de regulador de pH Chase. Se realizó una prueba de flujo lateral durante 10 minutos, y si la muestra contiene suficiente lentivirus dentro de los 5 minutos comenzará a aparecer una banda de prueba (T) y alcanzará la intensidad máxima a los 10 minutos. Cuando la prueba esté funcionando correctamente siempre aparecerá la banda de control (C). Después de 10 minutos, se logra la alineación y la distancia focal adecuadas para obtener imágenes usando el contorno del casete en la ventana de escaneo. El nombre de la muestra aparece debajo del contorno del casete. Una vez que se logró la alineación adecuada, el contorno se volvió verde y el casete se escaneó automáticamente. Para calcular las IFU/ml reales de una solución madre desconocida, se utilizó un virus de referencia con un título conocido medido por la expresión de CD8 (una solución madre de virus para la cual se conocen las IFU/ml) y se analizó para obtener tanto un valor de unidades infecciosas como un valor GV de GoStix™. Se calculó la relación IFU/GV para el virus de referencia. Se analizó la muestra desconocida utilizando Lenti-X™ GoStix™ Plus para obtener el GV (ng/ml p24) y para determinar las IFU/ml se realizó el siguiente cálculo: [Fórmula: GV (desconocido) x (IFU/ml)/GV (referencia) = IFU/ml (desconocido)].

b. Evaluación de la función del TCR de HPV16-E7₁₁₋₁₉

(i) Modificación de células T para que expresen TCR específicos de HPV16-E7₁₁₋₁₉

Se aislaron células pan-T de PBMC de donantes sanos positivos para HLA-A*02:01 utilizando el kit de aislamiento de células T humanas EasySep (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T aisladas se activaron con el cóctel activador de células T CD3/CD28/CD2 de ImmunoCult (StemCell Technologies) y se cultivaron

durante toda la noche en medio para células T completo (X-VIVO 15 [Lonza, Morristown, NJ] suplementado con suero humano al 5 % [Sigma Aldrich], penicilina-estreptomicina al 1 % [Thermo Fisher Scientific], suplemento 1X GlutaMax™ [Thermo Fisher Scientific], 5 ng/ml de IL-7 [R&D Systems] y 50 UI/ml de IL-2 [Sigma Aldrich]). 24 horas después de la activación, las células T se transdujeron con sobrenadantes virales de TCR de HPV16-E7₁₁₋₁₉. 24 horas después de la transducción, las células T se lavaron y transfirieron a placas G-Rex (Wilson Wolf, New Brighton, MN) o placas de 96 pocillos VECCELL (Cosmo Bio, Carlsbad, CA), y se expandieron para obtener un total de 7-11 días posteriores a la activación. Los cultivos de células T se complementaron con IL-2 fresca (50 UI/ml) e IL-7 (5 ng/ml) cada 2-3 días y/o se dividieron para mantener densidades celulares óptimas.

(ii) Citometría de flujo de células pan-T transducidas con TCR de HPV16-E7₁₁₋₁₉ modificado

Las células pan-T modificadas se tiñeron con dextrámero de HLA-A*02:01 HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) (Immudex), TCR α/β PE-Cy7 (IP26, BioLegend), CD8 PerCP-Cy5,5 (HIT8a, BioLegend), CD4 APC-Cy7 (OKT4, Biolegend), y CD34 Alex Fluor 488 (QBEND/10, R&D Systems) y DAPI de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las células se corrieron en el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) y se analizaron usando el software FlowJo (versión 10, TreeStar).

(iii) Líneas celulares

Se adquirieron la línea celular de linfoblastos T T2 (ATCC CRL-1992), la línea celular de adenocarcinoma NCI-H1792 (ATCC CRL-5895), la línea celular de carcinoma epidermoide Ca Ski (ATCC CRL-1550); y las líneas celulares de carcinoma de células escamosas SCC152 (ATCC CRL-3240), SCC090 (ATCC CRL-3239) y SiHa (ATCC HTB-35) de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células T2 se cultivaron en IMDM que contenía 20 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific]. Las células Ca Ski y NCI-H1792 se cultivaron en RPMI 1640 que contenía 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific]. SCC152, SCC090 y SiHa se mantuvieron en EMEM que contenía 10 % de FBS inactivado por calor, 1 % de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific] y suplemento 1X GlutaMax [Thermo Fisher Scientific].

(iv) Generación de líneas celulares estables que expresan Incucyte® Nuclight Red

Se transdujeron las células T2, NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090 y SCC152 con reactivo IncuCyte® NucLight Red Lentivirus (promotor EF-1 α , selección de puromicina) (Sartorius) en medios sin suero a una MOI de 5. 24 horas posteriormente a la transducción, se lavaron las células y resuspendieron en sus respectivos medios de línea celular y se cultivaron a 37 °C, 5% CO₂. Tres (3) días después de la transducción, a los cultivos se les agregó puromicina (Gibco, Waltham, MA) en una concentración predeterminada (dentro del rango entre 0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml) para seleccionar las células transducidas. Los cultivos se expandieron bajo selección con puromicina hasta que fueron por lo menos 98 % positivos para Incucyte® NucLight Red según se determinó mediante análisis por citometría de flujo.

(v) Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro* para células T2 en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano recubiertas con poli-L-ornitina (Sigma Aldrich) durante 30 minutos a la temperatura ambiente (TA), después de lo cual se retiró la solución de recubrimiento y las placas se dejaron secar durante otros 30 minutos a la temperatura ambiente. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* para líneas de células adherentes se realizaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano sin recubrimiento con poli-L-ornitina, donde las células adherentes se colocaron en placas y se les permitió adherirse el día antes de agregar las células T. Donde se indica, las células T se cocultivaron con Incucyte® NucLight™ Red que expresaba NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090, SCC152 o células T2 pulsadas con péptido (1 ng/ml de péptido HPV16-E7₁₁₋₁₉ [YMLDLQPET, Genscript]) en proporciones E:T dentro del rango entre 20:1 y 1,25:1. Los datos se adquirieron en un instrumento Incucyte® S3 (Sartorius) y el crecimiento de células diana se cuantificó en el Incucyte S3 como una lectura de la citotoxicidad de las células T.

(vi) Ensayo de producción de citoquinas

Las células T se cocultivaron con células Incucyte® NucLight™ Red que expresan NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090 y SCC152 o células T2 pulsadas con péptido (1 ng/ml de péptido HPV16-E7₁₁₋₁₉ [YMLDLQPET, Genscript]) a una E:T de 1:1. Los sobrenadantes se recolectaron 24 horas después y se congelaron a -80 °C. Se descongelaron los sobrenadantes y cargaron en un cartucho multiAnalyte (ProteinSimple, San Jose, CA) para evaluar los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-

2 y granzima B usando el instrumento Ella (ProteinSimple).

(vii) Ensayo de proliferación

Se marcaron las células T con CellTrace™ Violet 2,5 µM (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T se cocultivaron con CaSki, SCC152, 5 SCC090, SiHa y NCI-H1792 que expresaban Incucyte® NucLight™ Red. Después de 96 horas, se recolectaron las células y se tiñeron con colorante de viabilidad fijable eFluor® 660 (Thermo Fisher Scientific), anticuerpos TCR α/β PE-Cy7 (IP26, BioLegend), CD4 APC-Cy7 (OKT4, BioLegend) y CD8 PerCP-Cy5. 5 (HIT8a, BioLegend). Se lavaron las células con regulador de pH EasySep™ y se fijaron con regulador de pH de fijación BD Cytotfix™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se 10 diluyeron unas esferas CountBright™ Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific) en regulador de pH EasySep™ y se agregaron a las muestras antes de la adquisición en el citómetro de flujo CytoFLEX para evaluar la dilución de CellTrace™ Violet como indicador de la proliferación de células T. Los datos se analizaron con el software FlowJo (versión 10, TreeStar) y los recuentos absolutos de células T CD8 y CD4 divididas se determinaron con la fórmula:

15
$$\text{n.º de células T CD8 o CD4 en la muestra} = (\text{n.º de eventos de células T CD8 o CD4 en la puerta} / \text{n.º de eventos de esferas en la puerta}) \times \text{recuento de esferas asignado específico del lote.}$$

c. Alorreactividad y cribados de seguridad

(i) Generación de matrices que expresan MHC basadas en 96 pocillos para cribados de alorreactividad

20 Se noquearon los HLA-A/B/C endógenos en células HEK293T mediante ingeniería CRISPR-Cas. Los ARN guía (ARNg) se diseñaron contra secuencias conservadas en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C utilizando la herramienta multicrispr.net (Prykhodzhiy y col., Plos One, 2015). Se seleccionaron las siguientes guías: CRISPR-ALL-1: CGGCTACTACAACCAGAGCG, CRISPR-ALL-2: AGATCACACTGACCTGGCAG, CRISPR-ALL-3: AGGTCAGTGTGATCTCCGCA. Se 25 clonaron los ARNg en el vector LentiCRISPR V2 usando sitios BsmBI. Las células HEK293T se transfectaron con construcciones guía de plásmidos usando Mirus TransIT (Mirus Bio, Madison, WI). Después de 7 días, las células con el MHC noqueado (MHC-KO) se clasificaron usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend). Se expandieron clones unicelulares y se verificó la ausencia de MHC mediante citometría de flujo. Se usaron células con noqueo de B2M (B2M-KO) como control

positivo para la ausencia total de expresión de MHC en la superficie. Se noqueó B2M en células HEK293T mediante electroporación de CRISPR RNP dirigidos a B2M utilizando el ARN guía: GGCCACGGAGCGAGACATCT.

Se transdujeron células HEK293T nulas para MHC con virus IncuCyte® NucLight™ Red (Essen BioScience). Las células transducidas se clasificaron en base a la expresión de NucLight™ Red utilizando un clasificador Sony SH800. Para generar un arreglo que expresase MHC, se transdujeron células HEK293T que expresaban NucLight™ Red nulas para MHC con los 110 MHC más comunes (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en pocillos individuales en placas de 96 pocillos. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Las células que expresaban los 110 MHC más comunes se pasaron y almacenaron en placas de 96 pocillos como un arreglo. La expresión de los alelos MHC individuales se verificó mediante tinción usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend).

Para generar el control positivo para el ensayo, se transdujeron células HEK293T nulas para MHC con virus IncuCyte® NucLight™ Red (Essen BioScience) y se clasificaron en base a la expresión de NucLight™ Red usando un clasificador Sony SH800. Luego se introdujo HLA-A*02:01 (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en las células usando transducción lentiviral. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Luego de eso, estas células se transdujeron con una construcción de 90 unidades (pHAGE-CMV-FHA-HPV16-E7,1-EFS-AmCyan) que expresaba un fragmento de HPV16-E7, que contenía el epitope HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET). Luego de eso, las células transducidas se clasificaron para determinar la expresión de AmCyan utilizando un clasificador espectral de células Bigfoot (Thermo Fisher Scientific).

(ii) Empaquetado y transducción lentiviral

Para empaquetar los lentivirus de las construcciones de expresión de 110 MHC (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT), se sembraron células HEK293T nulas para MHC con una confluencia del 75 % en placas de 96 pocillos y se transfectaron con el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las construcciones de expresión de MHC individuales se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio DMEM 24 horas

después de la transfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se usaron para la transducción de los 110 MHC en un formato de matriz basado en 96 pocillos. Para empaquetar los lentivirus de otras construcciones, se sembraron células Lenti-X® (Takara Bio USA, Mountain View, CA) con una confluencia del 75 % y se transfectaron usando el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las construcciones de expresión se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio OptiPRO™ SFM 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se concentraron utilizando concentradores centrífugos Vivaspin® 20 o casetes Vivaflow® 50 (Sartorius, Bohemia, NY).

Toda la transducción viral relacionada con líneas celulares derivadas de células HEK293T se realizó con polibreno (4 µg/ml).

(iii) Cocultivo para elaboración de perfiles de alorreactividad

Se modificaron las células pan-T como se describió precedentemente y se congelaron. El día 0, se reestimularon las células T en matraces T25 verticales con 1,0E+6 células T, 20,0E+6 PBMC irradiadas, IL-2 humana recombinante y anticuerpo monoclonal CD3 (OKT3) [0,1 µg/ml, eBioscience]. Los días 2, 4, 5 y 6 la mitad del volumen de los medios se intercambió con RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % [FBS], 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ]. Las células se cosecharon para el ensayo el día 7.

El ensayo se realizó por triplicado. El día 5, las células diana de la matriz de 96 pocillos se pasaron y sembraron en placas de 384 pocillos. El día 6, se agregaron células T CD8+ modificadas genéticamente que expresaban el E7-11-28 TCR recombinante (que también se conoce como "TCR 28" o "28" o "TCR-200-A02") o células T de control no transducidas en una relación efector a diana (E:T) de 5:1 y se incubaron con células diana durante 48 horas. Se midió el número de células diana en el transcurso del tiempo usando IncuCyte®, midiendo el número de células positivas para NucLight™ Red. La inhibición celular a las 48 h por el TCR recombinante de interés en cada MHC del ensayo se calculó como $1 - \frac{\text{Duplicación del número de células [Incubadas con células T que expresan E7-11-28]}}{\text{Duplicación del número de células [Incubadas con células T de control no transducidas]}}$

con células T de control no transducidas]).

(iv) Generación de células T CD8 que expresan TCR E7-11-28 para cribados de seguridad

Se aislaron células T CD8⁺ primarias de un donante A*02:01 negativo con el kit de microesferas CD8 StraightFrom® Leukopak® (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células aisladas se congelaron en CryoStor® CS10 (Stem Cell Technologies) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El día -1 se descongelaron las células T CD8⁺, se lavaron con medio para células T completo (RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/ml, R&D Systems] e IL-7 humana recombinante [5 ng/ml, R&D Systems]. El día 0, las células T CD8⁺ se lavaron y resuspendieron en medio para células T fresco y se activaron usando el activador de células T de CD3/CD28/CD2 humanos ImmunoCult™ (5 µl por 1 x 10⁶ células T CD8⁺, Stem Cell Technologies). El día 1, las células se lavaron y se resuspendieron en medio para células T completo fresco y se transdujeron con partículas lentivirales para que expresen TCR E7-11-28 a una MOI de 10. El día 2, se lavaron las células y se resuspendieron en medio para células T completo fresco y se expandieron hasta el día 5 en placas G-Rex® de 24 pocillos (Wilson Wolf). El día 5, las células se cosecharon y se resuspendieron en regulador de pH EasySep™ (Stem Cell) y se agregó dextrámero HLA-A*02:01 HPV16₁₁₋₁₉-APC (Immudex) a una dilución de 1:25 durante 20 minutos a la temperatura ambiente. Se agregó Anti-CD34-Alexa Fluor®488 (Clon: QBEnd10, R&D Systems) a una dilución de 1:50 y se incubó durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Se lavaron las células con regulador de pH EasySep™ y se resuspendieron en regulador de pH EasySep™ que contenía 7-AAD a una dilución de 1:200. Las células de unión a dextrámero vivas (DAPI-Dextramer⁺ CD34⁺) se aislaron mediante clasificación celular (Beckman Coulter MoFlo Astrios EQ). Las células clasificadas se lavaron y resuspendieron en medio para células T completo fresco y se expandieron a 10 frascos G-Rex® (Wilson Wolf) hasta el día 12, en cuyo momento las células se congelaron en CryoStor® CS10 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Se descongelaron las células T CD8⁺ que expresaban E7-11-28 y se reestimularon (expansión adicional) mediante cocultivo de células T con PBMC alogénicas HLA-A*02:01

irradiadas (60 Gray). en presencia de 0,1 µg/ml de anti-CD3 (OKT3, eBioscience) y 50 U /ml de IL-2 recombinante (PeproTech) en medio para células T fresco (RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech]) en frascos GRex® 100 (Wilson Wolf). A las células en expansión se les agregaron 50 U/ml de IL-2 recombinante cada dos días hasta el día 6. El día 6, se reemplazó la mitad del medio de cultivo por medio para células T fresco que contenía 50 U/ml de IL-2 recombinante. El día 7 las células se usaron para los cribados.

(v) Control de calidad (QC) de la muerte en diana causada por las células T

El día 5 de la reestimulación, las células informantes (que expresaban la biblioteca de péptidos) se marcaron con CellTrace™ Violet (Thermo Fisher) durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La reacción de marcado se detuvo con un exceso de 5X de medio DMEM completo (DMEM 1X complementado con FBS al 10 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). Después de la centrifugación, se sembraron las células para ensayos posteriores. Para el cribado de elementos inespecíficos, en un matraz CellSTACK® se sembraron 400 x 10⁶ células informantes marcadas. Para el control de calidad de la muerte en el objetivo causada por las células T, se sembraron 25.000 células informantes por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos

El día 6 de la reestimulación con TCR E7-11-28, se analizó la actividad de las células T contra el péptido HPV16₁₁₋₁₉. Como control positivo, se pulsó una fracción de células informantes con 100 ng/ml de péptido HPV16₁₁₋₁₉ (Genscript) durante una hora. A las células informantes se les agregaron células T en cuatro relaciones efector:diana (E:T) (2:1, 1:1, 1:2, 1:4) por triplicado. Después de cuatro horas de incubación a 37 °C, antes de la adquisición de datos en un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) se resuspendieron las células pipeteando hacia arriba y abajo.

(vi) Cribado de cocultivos, enriquecimiento y clasificación de células diana

El día 7 de la expansión del TCR E7-11-28, se agregaron células T a las células informantes transducidas de la biblioteca y se incubaron a 37 °C durante cuatro horas. Después de la incubación, se recogieron todas las células mediante tripsinización y centrifugación, se resuspendieron las células en regulador de pH de unión a anexina V 1X (Miltenyi Biotec) y se

centrifugaron. Se resuspendieron las células con microesferas magnéticas de anexina V (Miltenyi Biotec) en regulador de pH de unión a anexina V 1X (1 ml de microesferas en 9 ml de regulador de pH de unión a anexina V por 1×10^9 células totales) y se incubaron a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron con 5 veces el volumen de regulador de pH de unión a anexina V y se centrifugaron. Se resuspendieron las células en regulador de pH de unión a anexina V y luego se dividieron en 2 "megareps" y se filtraron utilizando un filtro para células de 70 μ M (Corning). Las células marcadas con anexina V se seleccionaron positivamente usando un aparato AutoMACS® Pro (Miltenyi Biotec). La elución de cada "megarep" se dividió en cuatro "réplicas" para obtener un total de 8 réplicas técnicas por cribado. Las células IFP+ se clasificaron utilizando un clasificador de células MoFlo® Astrios EQ (Beckman Coulter).

(vii) Secuenciación de nueva generación

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de las células clasificadas mediante el kit de purificación de ADN genómico GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific). Se amplificó el casete de antígeno a partir del ADNg extraído mediante PCR y luego en una segunda reacción de PCR se le agregaron adaptadores de secuenciación y secuencias índice específicas de la muestra. Se secuenciaron los amplicones en un equipo Illumina NextSeq™ utilizando el cebador de secuenciación estándar de Illumina.

(viii) Análisis de datos

Las secuencias de nucleótidos se mapearon a mosaicos de nucleótidos individuales. Se calculó la proporción de recuentos de lectura para cada mosaico para cada réplica de cribado ($n = 8$) y para la entrada de cada agrupación de células informantes transducidas, y se calcularon los enriquecimientos de cada mosaico dividiendo la proporción del mosaico en la réplica de cribado por la proporción del mosaico en la biblioteca de entrada. Se utilizó una media geométrica modificada del enriquecimiento de un mosaico idéntico a través de las 8 réplicas de cribado para identificar aciertos del cribado reproducibles. Se predijeron los epitopes de unión específica a MHC para cada mosaico por encima del umbral de enriquecimiento de 1,5 veces utilizando NetMHC4.0. Se seleccionaron los epitopes candidatos para cada mosaico mediante la identificación de epitopes de unión fuerte predichos compartidos entre mosaicos adyacentes y redundantes superpuestos que se enriquecieron en el cribado.

d. Evaluación de seguridad del TCR E7-11-28

(i) Líneas de células cancerosas que expresan elementos inespecíficos putativos del TCR

E7-11-28

5 Las líneas de células cancerosas se cultivaron en los medios que se describen en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4: Líneas de células cancerosas y sus medios de cultivo

Líneas de células cancerosas	Medio de cultivo
CAL-12T	DMEM + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
THP-1	RPMI-1640 + 10 % HIFBS + 1X Pen/Strep + 2-mercaptoetanol (0,05 mM)
4.1TF-1	RPMI-1640 + 10 % HIFBS + 1X Pen/Strep + GM-CSF (2 ng/ml)
OVCAR-3	RPMI-1640 + 10 % HIFBS + 1X Pen/Strep + insulina bovina (0,01 mg/ml)
SNU-475	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
NCI-H1792	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
ChaGo-K-1	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
JVM-2	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
L363	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
SET-2	RPMI-1640 + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
CMK	RPMI-1640 + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
OCI-M1	IMDM + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
OCI-M2	IMDM + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
HEK-293	DMEM + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep

(ii) Células primarias humanas sanas/derivadas de iPS que expresan elementos inespecíficos putativos del TCR E7-11-28

10 Se descongelaron células primarias o las células derivadas de iPS de donantes sanos y se

cultivaron en los medios descritos en la Tabla 5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivaron preadipocitos blancos humanos (HWP) subcutáneos en medio de cultivo de preadipocitos (listo para usar) hasta una confluencia del 80-90 % y se diferenciaron a adipocitos cambiando el medio a medio de diferenciación de preadipocitos (listo para usar) durante 72 horas.

5 Se continuaron cultivando en medio de nutrición de adipocitos durante 14 días para completar el proceso de diferenciación.

Tabla 5: Células primarias humanas sanas/derivadas de iPS y sus medios de cultivo

Células	# de lote de las células	Medio de cultivo
Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)	466Z026, 0000246083	Medio de cultivo para células endoteliales (listo para usar)
Fibroblastos pulmonares humanos (HPF)	474Z024.2, 446Z03, 1474Z031.2, 1081503.2	Medio de cultivo de fibroblastos (listo para usar)
Células epiteliales de las pequeñas vías aéreas humanas (HSAEpC)	467Z033, 467Z025.2	Medio de cultivo para células epiteliales de las vías respiratorias (listo para usar)
Preadipocitos blancos humanos subcutáneos (HWP)	454Z006, 467Z014	Medio de cultivo de preadipocitos (listo para usar)
Células de músculo liso aórtico humano (HAoSMC)	453Z011.6, 470Z011.2	Medio de cultivo para células de músculo liso 2 (listo para usar)
Miocitos cardíacos humanos (MCH)	463Z016.2, 470Z011.9, 472Z002.3	Medio de cultivo de miocitos (listo para usar)
Astrocitos iCell	01434	Medio DMEM/F-12, HEPES + 2% FBS + suplemento 1X N-2
Astrocitos humanos normales	0000672445	Medio de cultivo de astrocitos

(NHA)		AGM™ BulletKit™
Células estrelladas hepáticas humanas (HHSteC)	C212011, C212641	Medio para células estrelladas SuperCult®
Células estrelladas hepáticas humanas (HHSteC)	25914	Medio para células estrelladas
Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF)	472Z001.3, 471Z018.2, 477Z023.2	Medio de cultivo de fibroblastos (listo para usar)
Fibroblastos cardíacos humanos (HCF)	472Z002.2, 475Z017.1	Medio de cultivo de fibroblastos 3 (listo para usar)
Queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK)	451Z014.1	Medio de cultivo de queratinocitos 2 (listo para usar)
Hepatocitos	HH1052, HH1165, HH1186	UPCM: medio universal para emplacado de células primarias
Células epiteliales del intestino delgado humano (HSIEpC)	201457	Medio de cultivo para células epiteliales
Células epiteliales cervicales humanas (HCerEpC)	202099	Medio de cultivo para células epiteliales
Células epiteliales cervicales humanas (HCerEpC)	70029809	Medio basal para células epiteliales cervicales + Kit de cultivo de células epiteliales cervicales
Células epiteliales mamarias humanas (HMEpC)	70043304	Medio basal para células epiteliales mamarias + Kit de cultivo de células epiteliales mamarias
Células del músculo esquelético (SkMC)	81202212	Medio basal para células madre mesenquimales para MSC derivadas de células adiposas, umbilicales y de médula ósea + kit de cultivo de músculo esquelético primario

Células mononucleares de médula ósea humana (HBMMNC)	2208422001, 2208412006, 2208412008	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
--	--	--------------------------------------

(iii) RT-PCR cuantitativa

Se extrajo el ARN total de líneas de células cancerosas o de células primarias humanas sanas utilizando el mini kit Qiagen RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinaron la calidad y la concentración del ARN en las muestras utilizando una máquina NanoDrop™ One^C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Para la síntesis de ADNc se usaron cantidades iguales de ARN (2 µg) de diferentes muestras usando el kit de síntesis SuperScript™ IV VILLO™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el termociclador T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con las siguientes condiciones de ciclo: alinear los cebadores a 25 °C durante 10 min, realizar la transcripción inversa del ARN a 50 °C durante 10 min e inactivar la enzima a 85 °C durante 5 min.

Todos los ensayos de qPCR se realizaron por triplicado con el sistema QuantStudio™ 7 Pro PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en un volumen de reacción de 20 µl que contenía 10 µl de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 5 µl de ADNc diluido (50 ng), 4 µl de agua libre de ARNasa/ADNasa y 1 µl de cada una de las sondas de ensayo TaqMan® específicas de genes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA): proteína de unión a motivo TATA (Hs00427620_m1), INTS4 (Hs00369250_m1), CPAMD8, (Hs00610855_m1) HERC1 (Hs01032486_m1), MPL (Hs00180489_m1), SPTA1 (Hs00162179_m1) y NUTM1 (Hs01395191_m1). Para todos los transcritos se utilizaron las siguientes condiciones estándar de reacción de PCR: 50 °C 2 min, 95 °C 2 min; 40 ciclos de 95 °C 1 seg, 60 °C 20 seg. Para las mediciones del ciclo de cuantificación (Cq) los datos se analizaron utilizando el software administrador de diseño y análisis QuantStudio™ (versión 2.6). Se aplicó el método $2^{-\Delta C_T}$ para la normalización interna utilizando la media geométrica del gen de mantenimiento de la proteína de unión al motivo TATA.

(iv) Ensayo de citoquinas para la evaluación de seguridad del TCR E7-11-28

Veinticuatro (24) horas antes de los ensayos de cocultivo, se separaron las líneas de

células cancerosas de sus matraces de cultivo utilizando el reactivo Gibco TrypLE™, se lavaron con medios y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 50.000 células/pocillo y se dejaron adherir durante toda la noche. Las células se pulsaron con 1 ng/ml o 100 ng/ml de péptido E7₁₁₋₁₉ durante 2 horas o se dejaron sin pulsar en sus respectivos

5 medios. Después de pulsar, los pocillos se lavaron suavemente tres veces con medios. Luego de eso, se agregaron células E7-11-28 o NTD a una densidad de 50.000 células/pocillo en medio para células T completo. Se recogieron los sobrenadantes 24 horas después del cocultivo, y se congelaron a -80 °C. Luego se descongelaron y se analizaron los niveles de IFN-γ cargándolos en un cartucho Simple Plex Human IFN-gamma (3ª generación) (ProteinSimple, San Jose, CA)

10 utilizando el instrumento Ella™. 24 horas antes de los ensayos de cocultivo, se separaron HUVEC, HPF, HSAEpC, HAoSMC, NHA y HHStEC de sus matraces o placas de cultivo utilizando DetachKit™ (PromoCell, Alemania), se lavaron y sembraron en sus respectivos medios a una densidad de 25.000 células/pocillo. Al día siguiente se pulsaron con el péptido o no se pulsaron, se lavaron y se cocultivaron con 50.000 células/pocillo de células E7-11-28 o NTD. Se sembraron

15 los HWP subcutáneos directamente en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano después de descongelarlos a la densidad recomendada por el proveedor y se diferenciaron en adipocitos maduros sin separarlos. Los HCM también se sembraron directamente en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano después de descongelarlos a la densidad recomendada por el proveedor y se cultivaron durante 40 días para permitirles madurar. Luego de eso, los adipocitos y los HCM se

20 pulsaron con péptidos o no se pulsaron y se cocultivaron con 50.000 células/pocillo de células E7-11-28 o NTD. Se descongelaron los astrocitos iCell y se colocaron en placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante en placas de cultivo de 24 pocillos durante 7 días. Al día siguiente se pulsaron con el péptido o no se pulsaron, se lavaron y se cocultivaron con 250.000 células/pocillo de células E7-11-28 o NTD. Se recogieron los sobrenadantes 24 horas después del cocultivo de

25 todas las células primarias/derivadas de iPS y células T, y se analizaron los niveles de IFN-γ en el instrumento Ella™.

e. Estudios de xenoinjerto de ratón

Se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* del TCR E7-11-28 en dos modelos de xenoinjerto

mediante inyección celular subcutánea de células CaSki y SCC152 en ratones NCG hembra de entre 7 y 9 semanas de edad (NOD-*Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}*/NjuCrl, Charles River). El programa de cuidado y uso de animales en Explora BioLabs está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), que asegura el cumplimiento de los estándares aceptados para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se cultivaron las células CaSki y SCC152 como cultivos adherentes en medio RPMI-1640 y EMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, respectivamente. Se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho 1×10^6 células tumorales CaSki o SCC152 en un volumen de 100 μ l que consistía en 50 % de PBS y 50 % de Matrigel®. Diez o catorce días después de la inyección, los animales se aleatorizaron en grupos experimentales en base al volumen del tumor (medido con calibres) de acuerdo con la fórmula: Volumen = $1/2$ (longitud del tumor x ancho perpendicular del tumor²).

Los días de dosificación, se descongelaron las células T en medio para células T completo, se lavaron y se resuspendieron en PBS estéril a una densidad de 2×10^7 células vivas por 0,2 ml. A cada animal de prueba se le inyectaron por vía intravenosa el vehículo (PBS), 2×10^7 NTD o células T TCR E7-11-28 vivas en la vena de la cola en un volumen fijo de 0,2 ml

Los efectos sobre el crecimiento tumoral se evaluaron mediante medición del crecimiento dos veces por semana.

f. Modificación de células T doble positivas HPV16 E7-11-28 y DN-TGF β RII y evaluación de la función de DN-TGF β RII

La modificación de células T con lentivirus se llevó a cabo como se describió en la sección 'Modificación de células T para que expresen TCR específicos de HPV16 E7₁₁₋₁₉' (véase la Sección b(i) precedente), excepto que las células T se cotransdujeron con dos lentivirus que codifican (1) TCR E7-11-28 y CD8 α marcado con Q y (2) DN-TGF β RII. La expresión de TCR E7-11-28, CD8 marcado con Q y DN-TGF β RII se verificó mediante citometría de flujo. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpos contra TGF β RII (W17055, BioLegend) y se separaron por FACS en fracciones de DN-TGF β RII-positivos (TGF β RII brillante) y DN-TGF β RII-negativos (TGF β RII opaco). Las células T se dejaron en reposo durante la noche en medio de células T suplementado con IL-2 50 UI/ml (Sigma Aldrich) e IL-7 5 ng/ml (R&D Systems) y luego se plaquearon en placas de 12 pocillos en medio de células T que contiene 0 o 5 ng/ml de TGF β 1

(R&D Systems). Después de 24 h de incubación en la presencia versus ausencia de TGFβ1, se estableció un ensayo de cocultivo con células T2 pulsadas con péptido. Para ello, se pulsaron células T2 con el péptido E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET, Genscript) a varias concentraciones (0,7 pg/ml, 7,4 pg/ml, 22 pg/ml, 67 pg/ml, 200 pg/ml y 2,000 pg/ml) y se plaquearon con células T a una relación de E:T de 1:1 en 50% de medio de células T y 50% de medio de células diana (RPMI 1640 que contiene 10% de FBS inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific)); el TGFβ1 se agregó a una concentración final de 0 o 5 ng/ml. Después de 20 h, se agregó GolgiPlug™ (BD Biosciences) al cocultivo. Las células se incubaron durante 4 h adicionales y luego se tiñeron para IFNγ intracelular. La unión no específica al receptor Fc se inhibió mediante incubación de las células durante 15 minutos con Fc block (Thermo Fisher Scientific). Subsecuentemente, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD34 humano biotinilado (QBEND10, Thermo Fisher Scientific) seguido por estreptavidina conjugada con Brilliant Violet™ 421 (BD Biosciences), anticuerpo anti-CD3 FITC humano (HIT3a, BioLegend) y colorante LIVE/DEAD™ del infrarrojo cercano fijable (Thermo Fisher Scientific). Las células se fijaron con Cytotfix™ (BD Biosciences), se permeabilizaron con solución amortiguadora Perm/Wash™ (BD Biosciences) y se tiñeron con anticuerpo anti-IFNγ-PE humano (B27, BioLegend). Las muestras se obtuvieron con un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) y se analizaron usando el software FlowJo (versión 10, TreeStar). Se determinó el porcentaje de células IFNγ+ dentro de la población de células T vivas marcadas con Q (LIVE/DEAD™-CD3+CD34+).

Como se describirá más adelante, el término “TSC-200-A02” se refiere a una población de células T completas modificadas, incluyendo células T CD8+ y células T CD4+, que expresan E7-11-28 (es decir, la secuencia de TCR-200-A02 que se describió precedentemente en la Tabla 1) además de otros componentes, que incluyen CD8α, CD8β, una marca de enriquecimiento de CD34 (por ejemplo, una marca Q) y DN-TGF βRII.

g. Pruebas con Receptores

(i) Cultivo de DC

El aislamiento de monocitos se realizó el día -4 usando PBMC aisladas de donantes sanos HLA-A*02:01-positivos con el kit de selección de CD14 positivo humano II EasySep™ (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La pureza y la expresión de la

molécula coestimulante se evaluaron usando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos de CD14 (M5E2, BioLegend, Dedham, MA), HLA-A2 (BB7,2, BioLegend), CD80 (2D10, BioLegend), CD83 (HB15e, BioLegend) y CD86 (IT2,2, BioLegend). La expresión de CD14 era >90%. Los monocitos CD14⁺ se resuspendieron en medio AIM-V™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con GM-CSF recombinante humano e IL-4 (R&D Systems, Mineápolis, MN) a concentraciones finales de 800 UI/ml y 1000 UI/ml, respectivamente. El día -2, se agregó TNF- α recombinante humano (10 ng/ml), IL-6 (1000 UI/ml) e IL-1 β (2 ng/ml) (R&D Systems), así como PGE2 (1 μ g/ml, StemCell Technologies), al cultivo de monocitos.

(ii) *Aislamiento de células T naïve para CD8*

El día -1, se aislaron células T CD8 naïve autólogas de PBMC de donantes sanos que expresan HLA-A*02:01 usando el kit de aislamiento de células T CD8⁺ naïve humanas II EasySep™ (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La pureza se evaluó usando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos de CD8 α (HIT8a, BioLegend), CD45RO (UCHL1, BioLegend), CD45RA (HI100, BioLegend), CD56 (5,1H11, BioLegend), CD57 (HCD57, BioLegend) y CCR7 (G043H7, BioLegend). La pureza de las células T CD8 α ⁺ naïve era >90%. Las células se dejaron en reposo durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂ en medio de células T (medio libre de suero X-VIVO™ 15 [Lonza, Rockland, MD] o LymphoONE™ [medio libre de Xeno para expansión de células T LymphoONE, Takara, WK552] que contiene 10% de suero humano [Sigma Aldrich, St. Louis, MO], 1% de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific], 1% de GlutaMAX [Thermo Fisher]) y suplementado con IL-7 recombinante humana 10 ng/ml (R&D Systems).

(iii) *Cocultivo*

El día 0, se volvió a evaluar la pureza de células T CD8 usando el panel de anticuerpos idéntico al del día -1, y la maduración de DC se confirmó por un aumento de la expresión de HLA-A2, CD80, CD83 y CD86 y una disminución de la expresión de CD14. Las DC se pulsaron con el péptido HPV16 E7₁₁₋₁₉ 1 μ M (YMLDLQPET, GenScript [Piscataway, NJ]) así como con péptidos adicionales con diversas especificidades de antígeno (es decir, pruebas multiplexadas) durante 3 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Las DC pulsadas se cocultivaron con las células T CD8 naïve restadas en medio de células T suplementado con IL-12 (10 ng/ml) e IL-21 (60 ng/ml)

recombinantes humanas (R&D Systems). Los cocultivos se suplementaron con IL-7 e IL-15 recombinantes humanas (R&D Systems) entre los días 3 y 10. La tinción de dextrámeros para las células específicas de HPV16 E7₁₁₋₁₉ se efectuó el día 10 u 11 usando un A*02:01 HPV16 E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) dCODE dextramer® (Immudex, Copenhagen, Dinamarca, WB3823-PfBC0621),
 5 CD8α y TCRα/β (IP26, BioLegend) y DAPI (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

(iv) *Separación de células específicas del antígeno*

El día 12, las células se recolectaron y tiñeron con A*02:01 HPV16 E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) dCODE dextramer® (Immudex) junto con dCODE dextramers® (Immudex) específico de varios
 10 otros antígenos de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpos específico para CD8α y TCRα/β, y con DAPI como el día 10-11, y se separaron las células positivas para el dextrámero (CD8α⁺, DAPI⁻, TCRα/β⁺, dextrámero⁺) usando un separador de células Sony SH800S (Sony Biotechnology, San Jose, CA), un separador de células BigFoot (ThermoFisher Scientific) o un separador de células MoFlo® Astrios (Beckman
 15 Coulter, Brea, CA). Las células separadas fueron sometidas a secuenciación de TCRα/β de una sola célula usando la plataforma 10x Genomics (Pleasanton, CA).

(v) *NGS multiplexada y análisis usando la plataforma 10x Genomics*

Se prepararon bibliotecas de células individuales de acuerdo con el kit del reactivo 10x Chromium Next GEM Single Cell 5' v2 (Índice Dual) con la tecnología de la característica de
 20 código de barras para el mapeo de proteínas de la superficie celular y receptores inmunológicos (10x Genomics, protocolo CG000330 Rev A). Se capturaron hasta 15.000 células en gotas (GEM) y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor para obtener bibliotecas que proporcionaban información sobre VDJ y proteínas de la superficie celular. Las bibliotecas completamente ensambladas se secuenciaron con un instrumento Illumina NextSeq™ 2000
 25 (Illumina).

Las bibliotecas de VDJ y proteínas de la superficie celular se procesaron usando los canales de datos Cell Ranger 6.0.0 VDJ y COUNT (10x Genomics), respectivamente. Se utilizó el conjunto de datos de proteínas de la superficie celular que mide los dextrámeros dCODE dextramers® (Immudex) para desmultiplexar los datos VDJ a fin de determinar el epítopo que era

reconocido por cada TCR. Se asigó un epítopo diana a un código de barras celular si para un código de barras celular dado, las cuentas de dextrámeros totales eran mayores que 10 y un dextrámero representaba >90% de las cuentas totales. El uso de códigos de barras celulares compartidos entre las bibliotecas de VDJ y de proteínas de la superficie celular permitió identificar la diana de cada TCR secuenciado.

h. Modificación de células T para expresar TCR específicos de HPV16-E7₁₁₋₁₉ (Figura 15)

Se aislaron PBMC de leukopaks de donantes sanos HLA-A*02:01-positivos usando un sistema de procesamiento automático de células. Las PBMC aisladas, lavadas y concentradas se electroporaron para obtener ARNm que codifica transposasa y vectores de nanoplásmidos de transposones. Después de la electroporación, las células se dejaron en reposo durante la noche en medio de cultivo basal. A las 24 horas después de la electroporación, las células se activaron con citoquinas activadoras de células T CD3/CD28/CD2 y citoquinas estimulantes del crecimiento. El enriquecimiento en las células modificadas se realizó durante la fase de expansión del cultivo por medio de ventaja de crecimiento selectivo en la presencia de una molécula pequeña. Las células expandidas se cosecharon el día 15 y se reformularon en medio de criopreservación. Las células se criopreservaron usando un programa automático de congelamiento a velocidad controlada. Los datos se muestran en la Figura 15.

i. Materiales

Líneas celulares

- Lenti-X: Takara Bio USA, 632180
- Células T HEK293: ATCC, CRL-3216
- T2: ATCC, CRL-1992
- CaSki: ATCC, CRL-1550
- NCI-H1792: ATCC, 5895
- SCC090: ATCC, CRL-3239
- SCC152: ATCC, CRL-3240
- SiHa: ATCC, HTB-35
- CAL-12T: DSMZ, ACC 443

- THP-1: ATCC, TIB202
- TF-1: ATCC, CRL-2003
- OVCAR-3: ATCC, HTB-161
- SNU-475: ATCC, CRL-2236
- 5 • ChaGo-K-1: ATCC, HTB-168
- JVM2: ATCC, CRL-3002
- L363: DSMZ, ACC 49
- SET-2: DSMZ, ACC 608
- CMK: DSMZ, ACC 392
- 10 • OCI-M1: DSMZ, ACC529
- OCI-M2: DSMZ, ACC619

Células derivadas de iPS/primarias humanas sanas

- Células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC): PromoCell, C-12200
(Lote N° 466Z026)
- 15 • HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humanas, Donante individual, en EGM™: Lonza, CC-2517 (Lote N° 0000246083)
- Fibroblastos pulmonares humanos (HPF): PromoCell, C-12360 (Lote N° 474Z024.2, 446Z03, 1474Z031.2, 1081503.2)
- Células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas (HSAEpC):
20 PromoCell, C-12642 (Lote N° 467Z033, 467Z025.2)
- Preadipocitos blancos subcutáneos humanos (HWP): PromoCell, C-12735 (Lote N° 454Z006, 467Z014)
- Células de la musculatura lisa aórtica humanas (HAoSMC): PromoCell, C-12533
(Lote N° 453Z011.6, 470Z011.2)
- 25 • Miocitos cardíacos humanos (HCM): PromoCell, C-12810 (Lote N° 463Z016.2, 470Z011.9, 472Z002.3)
- Kit de astrocitos iCell, 01434: Fujifilm Cellular Dynamics
- Astrocitos humanos normales (NHA): Lonza, CC-2656 (Lote N° 0000672445)
- Células estrelladas hepáticas humanas (HHStEC): Creative Bioarray, CSC-C1496

(Lote N° C212011, C212641)

- Células estrelladas hepáticas humanas (HHSteC): ScienCell Research Laboratories, 5300 (Lote N° 25914)
- Células epidérmicas humanas normales (NHDF): PromoCell, C-12300 (Lote N° 471Z018.2), C-12302 (Lote N° 472Z001.3, 477Z023.2)
- Fibroblastos cardíacos humanos (HCF): PromoCell, C-12360 (Lote N° 472Z002.2, 475Z017.1)
- Queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK): PromoCell, C-12003 (Lote N° 451Z014.1)
- Hepatocitos: In vitro ADMET Laboratories, 82006 (Lote N° HH1052, HH1165, HH1186)
- Células epiteliales cervicales humanas (HCerEpC): iXCells Biotechnologies, 10HU-237 (Lote N° 202099)
- Células epiteliales del intestino delgado humanas (HSIEpC): iXCells Biotechnologies, 10HU-237 (Lote N° 201457)
- Células epiteliales cervicales humanas (HCerEpC): ATCC, PCS-480-011 (Lote N° 70029809)
- Células epiteliales de mama humanas (HMEpC): ATCC, PCS-600-010 (Lote N° 70043304)
- Células de la musculatura esquelética (SkMC): ATCC, PCS-950-010 (Lote N° 81202212)
- Células mononucleares de médula ósea humanas (HBMMNC): StemCell Technologies, 70001,2 (Lote N° 2208422001, 2208412006, 2208412008)

Animales

- Ratón NCG (NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*Il2rg*^{em26Cd22}/NjuCrl): Charles River Laboratories

Medios y suplementos

- X-VIVO 15, medio de células hematopoyéticas libre de suero, con L-glutamina, gentamicina y rojo fenol: Lonza, 04-418Q
- Suero AB masculino humano (inactivado por calor): Sigma Aldrich, H3667-100ML

- Penicilina, estreptomicina: Gibco, 15149-122
- Suplemento GlutaMAX™: Fisher Scientific, 35050061
- Medio RPMI-1640: ATCC, 30-2001
- Suero fetal bovino (FBS), inactivado por calor: Gibco, A3840102
- 5 • IMDM: ATCC, 30-2005
- Medio RPMI 1640 (1x) [+] D-glucosa 4,5 g/l, [+] solución amortiguadora HEPES 2,383 g/l, [+] L-glutamina, [+] bicarbonato de sodio 1,5 g/l, [+] piruvato de sodio 110 mg/l: Gibco, A10491-01
- Medio DMEM (1X) [+] D-glucosa 4,5 g/l, [+] L-glutamina, [+] bicarbonato de sodio 10 3,7 g/l: Thermo Fisher Scientific, 11965084
- DMEM (1x) [+] D-glucosa 4,5 g/l, [+] L-glutamina, [-] piruvato de sodio: Gibco, 11965
- Medio OptiPRO™ SFM: Thermo Fisher Scientific, 12309019
- Medio EMEM: ATCC, 30-2003
- 15 • Medio de crecimiento de células endoteliales (listo para usar): PromoCell, C-22010
- Medio de crecimiento de fibroblastos (listo para usar): PromoCell, C-23010
- Medio de crecimiento de células epiteliales de las vías respiratorias (listo para usar): PromoCell, C-21060
- Medio de crecimiento de preadipocitos (listo para usar): PromoCell, C-27410
- 20 • Medio de diferenciación de preadipocitos (listo para usar): PromoCell, C-27436
- Medio de nutrición de adipocitos (listo para usar): PromoCell, C-27438
- Medio de crecimiento de células de la musculatura lisa 2 (listo para usar): PromoCell, C-22062
- Medio de crecimiento de miocitos (listo para usar): PromoCell, CC-22070
- 25 • Medio DMEM/F-12, HEPES: Thermo Fisher Scientific, 11330
- Suplemento N-2: Thermo Fisher Scientific, 17502048
- Medio de crecimiento de astrocitos AGM™ BulletKit™: Lonza, CC-3186
- Medio de células estrelladas SuperCult®: Creative Bioarray, CM-1193W
- Medio de células estrelladas: ScienCell Research Laboratories, 5301

- DetachKit™: PromoCell, C-41220
- TrypLE™ Express: Thermo Fisher Scientific, 12605-010
- Medio de crecimiento de fibroblastos 3 (listo para usar): PromoCell, C-23025
- UCRM™: Medio de recuperación de criopreservación universal, 50 ml: In vitro

5 ADMET Laboratories, 81015

- UPCM™: Medio de plaqueado de células primarias universal, 50 ml: In vitro

ADMET Laboratories, 81016

- Medio de crecimiento de queratinocitos 2 (listo para usar): PromoCell, C-20011
- Medio de crecimiento de células epiteliales: iXCells Biotechnologies, MD-0041

10

- Medio basal de células epiteliales de mamífero: ATCC, PCS-600-030
- Kit de crecimiento de células epiteliales de mamífero: ATCC, PCS-600-040
- Medio basal de células madre mesenquimáticas para MSC derivadas de tejido

adiposo, umbilical y médula ósea: ATCC, PCS-500-030

- Kit de crecimiento de musculatura lisa primaria: ATCC, PCS-950-040

15

Soluciones amortiguadoras

- Solución amortiguadora EasySep: StemCell Technologies, 20144
- DPBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺): Gibco, 14190-122

Citoquinas

- IL-2 recombinante humana: Sigma Aldrich, 11147528001
- IL-2 recombinante humana: PeproTech, 200-02
- IL-7 recombinante humana: R&D Systems, 219-IL-025
- IL-15 recombinante humana: R&D Systems, 247-ILB-005
- TGFβ1 recombinante humano: R&D Systems, 7754-BH-025/CF

20

Kits

25

- Kit de aislamiento de células T humanas EasySep™: StemCell Technologies:17951
- Kit simple plex Ella™ para 32 muestras: ProteinSimple: SPCKB-PS-003027
- Kit de microesferas CD8 StraightFrom® Leukopak®: Miltenyi Biotech, 130-117-019
- Kit de microesferas Annexin V: Miltenyi Biotech, 130-090-201
- Cartucho de IFN-gamma humano Simple Plex (3ª Gen): ProteinSimple, SPCKB-PS-

002574

Anticuerpos y reactivos de tinción

- Anticuerpo monoclonal anti CD3 (OKT), grado funcional: eBioscience 16-0037-81
- Anticuerpo anti-CD8 α PerCp-Cy5.5 humano (clon: HIT8a): BioLegend: 300924
- 5 • Anticuerpo anti-CD4 APC-Cy7 humano (Clon: OKT4): BioLegend: 317418
- Anticuerpo anti-CD56 PE humano (Clon: 5.1H11): BioLegend: 362508
- Anticuerpo anti-CD57 PE humano (Clon: HCD57): BioLegend: 322312
- Anticuerpo anti-CD34 humano Alexa Fluor 488: (Clon: QBEND/10): R&D Systems,

FAB7227G

- 10 • Anticuerpo anti-HLA-A2 PE humano (Clon: BB7.2): BioLegend, 343306
- Anticuerpo anti-TCR α/β PE-Cy7 humano (Clon: IP26): BioLegend: 306720
- Anticuerpo anti-HLA-A,B,C APC humano: BioLegend, 311410
- Colorante de viabilidad fijable eFluor 660 (APC Channel) Thermo Fisher Scientific:

65-0864-14

- 15 • DAPI: Thermo Scientific: Thermo Scientific, 62248
- Cytotfix: BD Biosciences, 554655
- Anticuerpo anti-CD3 human FITC: (clone HIT3a): BioLegend: 300306
- Anticuerpo anti-CD34 human biotilado: (Clon QBEND/10): Thermo Fisher

Scientific: MA5-16924

- 20 • Anticuerpo anti-TGF β RII PE humano: (clon W17055) BioLegend: 399704
- Anticuerpo anti-IFN γ PE: (clon B27): BioLegend: 506507
- Anticuerpo anti-inhibidor de unión al receptor Fc humano: Thermo Fisher Scientific:

16-9161-73

- Colorante del infrarrojo cercano fijable LIVE/DEAD™: Thermo Fisher Scientific:

25 L10119

- Estreptavidina Brillante Violet™ 41: BD Biosciences: 563259
- GolgiPlug™: BD Biosciences: 555029
- Solución amortiguadora Perm/Wash™: BD Biosciences: 554723
- Violeta CellTrace™ (CTV): Thermofisher, C34557

- Colorante de viabilidad fijable eFluor® 660: Thermo Fisher Scientific: 65-0864-14
- Esferas de conteo absoluto CountBright™: Fisher Scientific: C36950
- Solución de tinción de viabilidad 7-AAD: BioLegend, 420404

Péptidos

- 5
- HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET): Genscript

Dextrámeros

- Dextrámero HLA-A*02:01 YMLDLQPET HPV16-E7₁₁₋₁₉: Immundex

Reactivos para CRISPR-Cas9 y electroporación

- 10
- Alt-R® S.p. Cas9 Nucleasa V3 (Lote N° 0000417827): IDT, 1081059
 - Alt-R® CRISPR-Cas9 ARNtracr (Lote N° 0000415438): IDT, 1072534
 - Unidad de núcleo 4D-Nucleofector™: Lonza, AAF-1002B
 - Unidad 4D-Nucleofector™ X: Lonza, AAF-1002X
 - Kit L SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X: Lonza V4XC-1012

Placas para cultivo tisular

- 15
- Placa de 24 pocillos G-Rex®: Wilson Wolf, 80192M
 - Placa de 6 pocillos G-Rex®: Wilson Wolf, 80240M
 - G-Rex® 100: WilsonWolf, 800400
 - Placa de 96 pocillos VECCELL: Cosmo Bio Co., VCL-V96WGPB-10-EX
 - Placa de 6 pocillos tratada con TC: Corning Costar, 3506

20

 - Placas de 24 pocillos tratadas con TC: Corning Costar, 3524
 - Placas de fondo plano de 96 pocillos: Corning Costar, 3595
 - Placas de fondo plano de 384 pocillos: Corning Costar, 3764
 - HYPERflask® M: Corning, 10020
 - CellSTACK®, 5 cámara con tapas de venteo, Corning, 3313

25

 - Tamiz de célula de nylon de 70 uM, Corning, 431751
 - Placa de fondo plano de 96 pocillos, recubierta con colágeno I CellAdhere™:

StemCell Technologies, 100-0366

- Placas de 6 pocillos recubiertas PureCol™: Millipore Sigma, CC302

Reactivos de empaquetamiento y producción de lentivirus

- Lenti-X™ GoStix™ Plus: Takara, 631281
- Reactivo de transfección jetPRIME®: Transfección Polyplus, 114-75
- Vivaspin® 20: Sartorius, VS2041
- Casetes Vivaflow® 50: Sartorius, VF05P4

5 Reactivos para RT-PCR cuantitativa

- Mini kit RNeasy®: Qiagen, 74104
- Mezcla maestra avanzada rápida TaqMan®: Thermo Fisher Scientific, 4444557
- SuperScript™ IV VILO™: Thermo Fisher Scientific, 11756050
- Agua grado RT-PCR: Thermo Fisher Scientific, AM9935

10 Reactivos de procesamiento de Leukopak:

- Bloque de columna multi-24: Miltenyi, 130-095-692
- Medio de separación de linfocitos: Corning, 25-072-CV

Otros reactivos

- Activador de células T CD3/CD28/CD2 humanas ImmunoCult™: StemCell Technologies, 10970
- Solución de poli-L-ornitina 0,01%: Millipore-Sigma, P4957-50ML
- CryoStor CS10: StemCell Technologies, 07930
- Solución de tinción ViaStain AO/PI en PBS: Nexcelom Bioscience, CS2-0106-5 ml
- Nourseotricina: GoldBio, N-500-1
- Puromicina: Gibco, A11138-03
- Mirus TransIT, Mirus Bio MIR 2704
- Polibreno: EMD Millipore, TR-1003-G
- Reactivo para lentivirus Incucyte® NucLight Red (selección de puromicina, promotor EF-1 Alfa), Sartorius, 4476
- Laminina: Millipore-Sigma, L2020
- Poli-L-lisina 10 mg/ml: ScienCell Research Laboratories, 0413
- Matriz de membrana basal Corning® Matrigel® de concentración alta (HC), libre de LDEV, 10 ml, Nº Producto 354248

Ejemplo 2: Descubrimiento de los TCR específicos para HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET)

Se desarrolló una plataforma de descubrimiento de TCR de alto rendimiento que permite una clonación rápida de TCR específicos del antígeno a partir de células T CD8 naïve primarias humanas y se usó para identificar los TCR específicos de HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET) (Figura 1). Se descubrió un total de 459 TCR. Se identificaron 59/293 y 15/161 TCR específicos de HPV16-E7₁₁₋₁₉ a partir de dos pruebas VAYG propias separadas, respectivamente (Figura 2 y Figura 6). Se identificó un subconjunto de los TCR que presentaba la expresión sobre la superficie celular y la función efectora deseadas, tales como citotoxicidad o producción de citoquinas (Figura 3, Figura 4 y Figura 7) usando una variedad de líneas celulares (véase la Tabla 6). En la Figura 8 se provee un resumen de los resultados que demuestran que TCR-28 muestra una citotoxicidad comparable y una función efectora superior con relación al TCR comparador.

Tabla 6: Referencia para la expresión en líneas celulares

Línea celular	Origen de la línea celular	HLA-A*02:01	HPV16
CaSki	Carcinoma de cuello uterino	+	+
SCC152	Carcinoma de células escamosas de la hipofaringe	+	+
SCC090	Carcinoma de células escamosas of la base de la lengua	+	+
SiHa	Carcinoma de cuello uterino	-	+
NCI-H1792	Carcinoma de pulmón	+	-

Además, se examinó y seleccionó el TCR E7-11-28 específico de HPV16-E7₁₁₋₁₉ en un ensayo de alorreactividad. TCR28 mostró una alorreactividad mínima definida en general por una inhibición de la célula diana de más del 20% (por ejemplo, sin alorreactividad detectable a 108 de

los 110 tipos de HLA diferentes evaluados) (Figura 5), indujo proliferación de células T específica del antígeno (Figura 9), no reaccionaba con líneas de células cancerosas que expresan elementos inespecíficos putativos (Figura 11) o células primarias humanas sanas (Figura 12) y controló eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 13). Aún más, se demostró que la supresión de la señalización de TGF β , tal como mediante el uso de DN-TGF β RII, vuelve a las células T TSC-200-A02 resistentes a una supresión mediada por TGF β (Figura 14). En efecto, la expresión y evaluación de TCR E7-11-28 en los vectores pNVVD154 y pNVVD160 representativos confirmó adicionalmente la actividad funcional del TCR (Figura 15A-15C).

Por consiguiente, se ha identificado una variedad de TCR específicos de HPV16-E7₁₁₋₁₉ que tienen las características deseables (por ejemplo, reconocimiento de la diana, expresión sobre la superficie celular, función citotóxica, alorreactividad baja, etc.) y se describen en la presente.

Incorporación a modo de referencia

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en la presente se incorporan a modo de referencia en su totalidad como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente indicada como incorporada a modo de referencia. En el caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo cualquier definición en la presente, prevalecerá.

También se incorpora a modo de referencia en su totalidad cualquier secuencia de polinucleótido y polipéptido cuya referencia a un número de acceso se correlaciona con una entrada a una base de datos pública, tales como aquellas mantenidas por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) en la Red de Informática Mundial en tigr.org y/o El Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) en la Red de Informática Mundial en ncbi.nlm.nih.gov.

Equivalentes y alcance

En la anterior descripción se han establecido los detalles de una o más formas de realización abarcadas por la presente invención. Aunque anteriormente se han descrito algunos ejemplos de materiales y métodos representativos, en la práctica o ensayo de las formas de realización abarcadas por la presente invención se pueden usar materiales y métodos similares o equivalente a los que se describen. Otras características, objetos y ventajas relacionados con la

presente invención serán evidentes al ver la descripción. A no ser que se los defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado con que comúnmente los entiende un especialista en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, predominará la presente descripción que se acaba de
5 proveer.

Aquellos especialistas en la materia reconocerán o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las formas de realización específicas abarcadas por la presente invención que se describe en la presente. No es la intención que el alcance abarcado por la presente invención sea limitado por la descripción que se
10 provee en la presente y la intención es que dichos equivalentes sean abarcados por las reivindicaciones adjuntas.

También se observa que la expresión "que comprende" se usa en un sentido abierto y permite, pero no requiere la inclusión de elementos ni pasos adicionales. Cuando en la presente se usa la expresión "que comprende", también se incluye y expresa el término "que consiste en".

Donde se dan rangos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que a no ser que se indique otra cosa o que sea evidente por el contexto y para la comprensión de un especialista en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor o subrango específico dentro de los rangos establecidos en las diferentes formas de realización abarcadas por la presente invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior
15 del rango, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.
20

Además, debe entenderse que cualquier forma de realización particular abarcada por la presente invención que se encuentre dentro de la técnica anterior puede ser excluida explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que se considera que tales formas de realización son conocidas para los especialistas en la técnica, pueden excluirse incluso si la
25 exclusión no se establece explícitamente en la presente. Cualquier forma de realización particular de las composiciones abarcadas por la presente invención (por ejemplo, cualquier antibiótico, ingrediente terapéutico o activo; cualquier método de producción; cualquier método de uso; etc.) puede ser excluida de una o más reivindicaciones, por cualquier motivo, relacionado o no con la existencia de arte anterior.

Debe entenderse que las palabras que se han utilizado son palabras descriptivas más que limitativas, y que se pueden realizar cambios dentro del alcance de la reivindicaciones adjunta sin apartarse del verdadero alcance y espíritu que abarca la presente invención en su aspectos más amplios.

5 Si bien la presente invención se ha descrito con cierta extensión y con alguna particularidad con respecto a las diversas formas de realización que se describen, no es la intención que deba limitarse a dichos detalles ni formas de realización ni a cualquier forma de realización particular, sino que debe interpretarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, de manera de proveer la interpretación más amplia posible de dichas reivindicaciones en vista del
10 arte anterior y, por lo tanto, para abarcar efectivamente el alcance que se desea que la presente invención abarque.