

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 224**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/32</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/02</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2014 PCT/US2014/064621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15070061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2014 E 14803300 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3066130**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-WT1/HLA**

30 Prioridad:

**07.11.2013 US 201361901310 P**  
**15.08.2014 US 201462037875 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2020**

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER (50.0%)**  
**1275 York Avenue**  
**New York, NY 10065, US y**  
**EUREKA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHEINBERG, DAVID;**  
**XIANG, JINGYI;**  
**DAO, TAO;**  
**YAN, SU y**  
**LIU, CHENG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 742 224 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos anti-WT1/HLA

5 Campo técnico

10 **[0001]** La presente invención se refiere en general a anticuerpos contra las proteínas citosólicas. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos contra la proteína oncogénica tumoral de Wilm (WT1), específicamente a anticuerpos biespecíficos que reconocen un péptido WT1 junto con un antígeno de histocompatibilidad principal, así como un antígeno mostrado en la superficie de una célula efectora inmune.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** El desarrollo de anticuerpos monoclonales similares al receptor de células T terapéuticas (TCRM mAbs), que reconocen fragmentos de péptidos de las proteínas intracelulares clave en el contexto de moléculas MHC de clase I, está emergiendo como un nuevo enfoque para dirigir antígenos específicos de tumores intracelulares (Ags). La mayoría de los Ags específicos de tumores son proteínas intracelulares, inaccesibles a la terapia de mAb clásica. Estas moléculas son degradadas, procesadas y mostradas por las moléculas del MHC de clase I como complejos péptido/MHC, que son reconocidos por el TCR de los linfocitos T citotóxicos (CTL). En consecuencia, se han intentado  
20 numerosos enfoques dirigidos a desencadenar respuestas de células T hacia la baja densidad de complejos péptido/MHC específicos de tumores, con éxito limitado. La proteína tumoral de Wilms (WT1) es un Ag específico para tumores humanos bien validado para la inmunoterapia de células T. WT1 se sobreexpresa en una amplia gama de tumores malignos hematopoyéticos humanos, células madre de leucemia y diversos tumores sólidos. En tejido adulto normal, la proteína tiene una expresión limitada y baja, lo que la convierte en un objetivo ideal específico para el cáncer  
25 (Gessler et al. Nature. 1990; 346 (6280): 194-197; Menssen et al. Leukemia. 1995; 9 (6): 1060-1067; Oji y otros, Jpn J Cancer Res. 1999; 90 (2): 194-204). Tanto las células T específicas del epítipo WT1 como los anticuerpos contra la proteína completa WT1 se detectaron en pacientes con tumores malignos hematopoyéticos y tumores sólidos, lo que indica que WT1 es un antígeno altamente inmunogénico (Gaiger et al. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2001; 7 (3 Suppl): 761s-5s; Gillmore et al. Clinical cancer research:  
30 an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006; 12 (1): 34-42). Además, se observó una correlación entre injerto contra leucemia y CTL detectables específicos para WT1 después del trasplante alogénico de células madre, lo que demuestra aún más la actividad terapéutica de estas células T.

35 **[0003]** Un fragmento de péptido derivado de WT1, RMFPNAPYL (RMF; SEQ ID NO: 1), es el epítipo mejor estudiado y más validado para el reconocimiento de células T CD8 en el contexto de la molécula HLA-A0201. El epítipo de RMF se ha utilizado ampliamente en vacunas peptídicas o como diana de las células CD8 T transferidas de forma adoptiva expandidas *ex vivo* de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome displásico mieloide (MDS) y varios tumores sólidos. Estos estudios demostraron la inmunogenicidad del epítipo peptídico, que se asoció con respuestas clínicas en algunos pacientes (Krug et al. Cancer Immunol Immunother. 2010; 59 (1467-1479); Maslak et al. Blood. 2010; 116 (2): 171-9; Keilholz et al. Blood. 2009; 113 (26): 6541-8; Oka et al. Scientific World Journal 2007; 7: 649-65; Oka et al. Proceedings de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos de América. 2004; 101 (38): 13885-90; Letsch et al. Y Keilholz, U., editor. Associate for Immunotherapy of Cancer: Cancer Immunotherapy - 2nd Annual Meeting; 2004; Mainz, Alemania).

45 **[0004]** A pesar del progreso significativo en la inmunoterapia con células T, las respuestas clínicas objetivas se observan raramente. La ineficiencia de las terapias basadas en células T se ha atribuido a bajas afinidades de TCR, respuestas citotóxicas potentes e *in vivo* limitadas contra altas cargas tumorales, la falta de persistencia de células efectoras, tolerancia a tumores de auto-tumor y la inmunosupresión por células T reguladoras (T- reg) y citoquinas (Morris et al. Blood Reviews 2006; 20: 61-69; Konnig R. Curr Opin Immunol 2002; 14 (1) 75-83). Para desarrollar un enfoque diferente para dirigir este importante epítipo de WT1, se generó un mAb TCRM completamente humano específico para el complejo RMF/HLA-A0201. El mAb mostró una potente actividad terapéutica contra la leucemia que expresa WT1 y los tumores sólidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Dao et al. Sci Transl Med. 2013; 5 (176): 176ra133).

55 **[0005]** La ADCC depende de la presencia de células asesinas naturales (NK), macrófagos, neutrófilos y otras células inmunes efectoras, que pueden ser extremadamente heterogéneas en pacientes con leucemias o cánceres, especialmente después de la terapia. Un enfoque alternativo y eficaz para mediar en la terapia citolítica de mAb es usar células T como células efectoras. Las células T se encuentran entre las células citotóxicas más potentes y representan el mayor número de células citotóxicas circulantes. Los enfoques recientes que agregan especificidad de mAb a las células T, como la transferencia adoptiva de células T diseñadas con receptores de antígenos quiméricos basados en anticuerpos (conocidos como CAR) y mAbs biespecíficos con especificidades duales para tumores Ags y células T CD3, han surgido como estrategias eficientes. para redirigir las células T humanas policlonales a Ags asociados a tumores bien definidos. Las construcciones de anticuerpos biespecíficos están diseñadas para entrecruzar la superficie Ag en células cancerosas con el complejo TCR/CD3 en células T. Las moléculas pueden redirigir tanto  
60 las células T CD4 como las CD8 para destruir células tumorales de una manera en serie que es independiente del reconocimiento intrínseco de TCR específico de Ag, las moléculas coestimuladoras y la expresión de HLA en las

células tumorales. También evita la vacunación, la administración de citoquinas o la expansión e infusión *ex vivo* de células T derivadas de pacientes específicas de Ag (Frankel y Baeuerle. *Current opinion in chemical biology*. 2013; 17 (3): 385-92; Brischwein et al. *Journal of immunotherapy*. 2007; 30 (8): 798-807; Nagorsen et al. *Pharmacology & therapeutics*. 2012; 136 (3): 334-42; Aigner et al. *Leukemia*. 2013; 27 (5): 1107-15; Spiess et al. *Nature biotechnology*. 2013; 31 (8): 753-8; Nagorsen y Baeuerle. *Experimental cell research*. 2011; 317 (9): 1255-60). El anticuerpo Blinatumomab (Amgen, Thousand Oaks, CA) biespecífico de células T (BiTE®), específico para el CD19 Ag de células pan B y la cadena de señalización CD3e del TCR, está ensayado por la FDA para el tratamiento de Linfoma de Hodgkin y leucemia linfocítica aguda (LLA).

10 **[0006]** El documento WO 2012/135854 identifica y caracteriza proteínas de unión a antígeno, tales como anticuerpos, que son capaces de dirigirse a proteínas citosólicas/intracelulares, por ejemplo, la oncoproteína WT1. Los anticuerpos descritos se dirigen a un complejo péptido/MHC tal como aparecería típicamente en la superficie de una célula luego del procesamiento del antígeno de la proteína WT1 y la presentación por parte de la célula.

15 **[0007]** El documento WO 2005/040220 enseña una construcción de unión específica a CD3 citotóxicamente activa que comprende un primer dominio que se une específicamente a CD3 humano y un segundo dominio de unión derivado de Ig.

#### Resumen de la invención

20 **[0008]** La invención proporciona un anticuerpo recombinante que comprende:

(I) una primera parte de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a WT1/HLA, que comprende uno de:

25 (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NO: 54, 18, 36, 72, 90, 108 y 132; o

30 (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: (i) 50 y 52; (ii) 14 y 16; (iii) 32 y 34; (iv) 68 y 70; (v) 86 y 88; (vi) 104 y 106; y (vii) 128 y 130; o

35 (C)

(i) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 40; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 45; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 46;

45 (ii) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;

50 (iii) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28;

55 (iv) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 56; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64;

60 (v) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 74; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75; una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:

76; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82; o

5 (vi) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 92; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 94; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 99; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 100; y

(II) una segunda porción de unión a antígeno que comprende:

15 (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113; o

20 (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NOS: 112 y 111 o una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 134 y 136.

**[0009]** La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante de la invención.

25 **[0010]** La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo recombinante o ácido nucleico de la invención.

**[0011]** La invención también proporciona la composición de anticuerpo o farmacéutica de la invención para uso en un método para tratar una enfermedad positiva para WT1 en un sujeto en el que la enfermedad positiva para WT1 es una leucemia crónica o leucemia aguda o cáncer WT1+.

30 **[0012]** La invención también proporciona un anticuerpo recombinante para su uso en un método para estimular una respuesta primaria de células T y una respuesta secundaria de células T en un sujeto que comprende administrar una composición que comprende el anticuerpo recombinante de acuerdo con la invención, en el que la respuesta de las células T primarias comprende estimular células T citotóxicas contra el primer antígeno tumoral, y en el que la respuesta secundaria de células Ts comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y/o contra un segundo antígeno tumoral.

**[0013]** Otras características de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

40 Resumen de la divulgación

**[0014]** Los anticuerpos biespecíficos que se han descrito anteriormente están dirigidos a Ags de la superficie celular bien conocidos, de alta densidad, que no son específicos de tumor. La presente divulgación se refiere a anticuerpos biespecíficos derivados de un mAb TCRm, designado ESK. El anticuerpo biespecífico de ESK fue capaz de unirse selectivamente a células tumorales positivas para WT1/HLA-A0201 y mostró una potente actividad terapéutica en múltiples modelos de cáncer humano al redireccionar la citotoxicidad de las células T humanas. La redirección de la población de células T al cáncer se demostró mediante el rastreo de imágenes diana y de las células efectoras duales. Los anticuerpos biespecíficos de TCRm mAb descritos en el presente documento son un potente agente terapéutico que se dirige a un Ag específico del tumor intracelular de baja densidad expresado ampliamente, por ejemplo, WT1. Los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento también son capaces de inducir una respuesta secundaria de células T específica para antígenos distintos de WT1.

55 **[0015]** En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo recombinante que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un péptido WT1 complejado con un antígeno principal complejo de histocompatibilidad tal como HLA-A2 y puede, por lo tanto, enlazarse con una célula WT1/HLA-A2\* incluso cuando WT1 está presente a baja densidad. El anticuerpo comprende además una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de superficie en una célula efectora inmune, por ejemplo, CD3, y, por lo tanto, también puede unirse a la célula efectora inmune.

60 **[0016]** En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo recombinante, en el que dicho anticuerpo recombinante comprende: (i) una primera porción de unión al antígeno que comprende: (A) una cadena pesada (HC) de la región variable que comprende HC-CDR1, HC-CDR2 y HC-CDR3; y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, LC-CDR2 y LC-CDR3, que comprende secuencias de aminoácidos como se exponen en las Tablas 1-6; (B) un VH y un VL que comprenden las secuencias de aminoácidos primera y segunda como se exponen en las Tablas 1-6; o (C) un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las Tablas 1-6; y (ii) una segunda porción de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la

Tabla 7. En una realización, el anticuerpo recombinante comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 10 (SEQ ID NO: 110).

5 [0017] En otro aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en este documento.

10 [0018] En un aspecto relacionado, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo biespecífico recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 [0019] En aún otro aspecto, la descripción se refiere a un método para matar a una célula WT1+, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula WT1+ con una que tiene la especificidad del anticuerpo para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una célula T citotóxica. En algunas realizaciones, la célula T citotóxica es una célula autóloga.

20 [0020] En aún otro aspecto relacionado, la descripción se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad positiva para WT1, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en el presente documento. En una realización, el método comprende además administrar al sujeto células T citotóxicas CD3+ que son autólogas. En una realización, la enfermedad positiva para WT1 es una leucemia crónica o leucemia aguda o cáncer WT1+, por ejemplo, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple (MM), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide/mielógena aguda (LMA). Síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cánceres gastrointestinales, cáncer de mama, cáncer de próstata o glioblastoma.

25 [0021] En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico recombinante que comprende una primera parte de unión a antígeno que comprende uno de: (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108 y 132; o (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: (i) 30 14 y 16; (ii) 32 y 34; (iii) 50 y 52; (iv) 68 y 70; (v) 86 y 88; (vi) 104 y 106; (vii) 128 y 130; o (C) (i) las siguientes tres regiones determinantes de complementariedad de VH (CDR): (a) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56, 74, 92 y 116; y (b) una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 21, 39, 57, 75, 35 93 y 117; y (c) una VL CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 22, 40, 58, 76, 94 y 118; y (ii) las siguientes tres CDR de VL: (a) una VL CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 26, 44, 62, 80, 98 y 122; y (b) una VL CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 27, 45, 63, 81, 99 y 123; y (c) una VL CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 28, 46, 64, 82, 100 y 124. El anticuerpo biespecífico recombinante comprende además una segunda unión a antígeno parte que comprende (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos 40 expuesta en la SEQ ID NO: 113; o (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NOS: 112 y 111 o la SEQ ID NOS: 134 y 136.

45 [0022] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para estimular una respuesta primaria de células T y una respuesta secundaria de células T en un sujeto que comprende la administración de una composición que comprende un anticuerpo recombinante, dicho anticuerpo recombinante que comprende una primera porción de unión a antígeno y una segunda porción de unión al antígeno, en donde dicha primera porción de unión al antígeno se une específicamente a un primer antígeno tumoral y dicha segunda porción de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno de superficie de las células efectoras inmunes, en donde la respuesta primaria de las células T comprende estimular las células T citotóxicas contra el primer antígeno tumoral, y en el que la respuesta secundaria de células Ts comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y/o 50 contra un segundo antígeno tumoral. En un aspecto, la respuesta secundaria de las células T no requiere células presentadoras de antígenos o moléculas coestimuladoras. En otro aspecto, la respuesta secundaria de células Ts comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el segundo antígeno tumoral. En un aspecto, el segundo antígeno tumoral es un antígeno tumoral no WT1-RMF.

60 [0023] En aún otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de producción de las células T efectoras y/o células T de memoria contra un antígeno tumoral que comprende la activación de una célula T con un anticuerpo biespecífico recombinante descrita en este documento. Las células T efectoras y/o las células T de memoria pueden producirse *in vivo* o *ex vivo*. En un aspecto, las células T efectoras y/o las células T de memoria se producen contra un antígeno tumoral no WT1-RMF, por ejemplo, HER2-neu.

65 [0024] Se pretende que la presente divulgación esté relacionada como un documento unificado, y debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en este documento, incluso si la combinación

de características no se encuentra en la misma oración, párrafo o sección de esta divulgación. Con respecto a los aspectos de la divulgación descrita o reivindicada con "un" o "una", debe entenderse que estos términos significan "uno o más", a menos que el contexto requiera de manera inequívoca un significado más restringido. Con respecto a los elementos descritos como uno o más dentro de un conjunto, debe entenderse que todas las combinaciones dentro del conjunto están contempladas. Si los aspectos de la divulgación se describen como "que comprenden" una característica, también se contemplan realizaciones "que consisten en" o "que consiste esencialmente en" la característica.

#### Breve descripción de los dibujos

[0025]

**La Figura 1** muestra la unión selectiva de una realización de un anticuerpo biespecífico de ESK a células tumorales y células T humanas medida por citometría de flujo. SET-2 (**1A**), HL-60 (**1B**) o células T CD3 humanas purificadas (**1C**) se tiñeron con anticuerpo ESK biespecífico o control a concentraciones de 10 µg/ml, 1 µg/ml o 0,1 µg/ml, seguido de un mAb secundario específico para la etiqueta His conjugado con FITC. El anticuerpo biespecífico de ESK mostró una unión selectiva a las células SET-2 a las concentraciones de 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml. El mAb secundario de control solo y el anticuerpo biespecífico de control en las concentraciones indicadas no se unieron a las células. Ninguno de ESK ni anticuerpos biespecíficos de control se unieron a HL-60 en todas las concentraciones ensayadas. Para las células T humanas en reposo, el anticuerpo ESK biespecífico mostró una unión más débil que el anticuerpo biespecífico de control. Intensidad de fluorescencia mediana (MFI) para anticuerpos específicos de ESK: 91,4, 41 y 13,2 a una concentración de 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml, respectivamente. Para el control de anticuerpos biespecíficos: 188, 153 y 26,2 a concentraciones de 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml, respectivamente. (**1D**) El anticuerpo biespecífico de ESK induce la secreción de IFN-γ en presencia de células tumorales WT1+/HLA-A0201+. Las células T humanas y las células SET-2 en una proporción de 15:1 se incubaron con o sin el anticuerpo ESK biespecífico o el anticuerpo biespecífico de control a una concentración de 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,1 µg/ml o 0,03 µg/ml durante la noche. Los sobrenadantes se recogieron y la liberación de IFN-γ se midió con un kit ELISA. Los cultivos de células T solas o células T con células SET-2, más el anticuerpo biespecífico de control no mostraron ningún IFN-γ detectable. Por lo tanto, sus valores se restaron de los datos mostrados. Los datos muestran el promedio de cultivos duplicados y representan uno de dos experimentos similares.

**La Figura 2** muestra que el anticuerpo ESK biespecífico dirige la citotoxicidad de las células T contra las células tumorales WT1+/HLA-A0201+. Las células T purificadas se incubaron con SET-2 (**2A**) o células HL-60 (**2B**) en una relación E: T de 40:1, en presencia o ausencia de ESK o anticuerpo biespecífico de control en las concentraciones indicadas. La citotoxicidad de las células T se midió mediante la liberación de <sup>51</sup>Cr después de 5 horas de incubación. De manera similar, la citotoxicidad dirigida por ESK de PBMC contra BV173 (**2C**) y blastos de CML (**2D**) de un paciente en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr de 6 h a una relación E: T de 100:1. La citotoxicidad mediada por anticuerpos biespecíficos de ESK por células T humanas cebadas con EBV se midió mediante un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr de 5 horas contra BV173 (**2E**), JMN (**2F**) y células de cáncer de ovario primario (**2G**) en la relación E: T indicada. Se utilizaron anticuerpos biespecíficos a 0,1 µg/ml. Todos los puntos de datos son promedios de cultivos por triplicado y representan uno de dos a tres experimentos similares.

**La Figura 3** muestra que el anticuerpo ESK biespecífico induce la activación de células T en presencia de células autólogas de cáncer de ovario. Las PBMC de un paciente en los números indicados/pocillo se incubaron con células de cáncer de ovario autólogas irradiadas, en presencia de 0,1 µg/ml de ESK o de un anticuerpo biespecífico de control durante los primeros 3 días. (**3A**) Las células se cultivaron durante un total de 7 días y en el día 8, se agregaron células tumorales autólogas marcadas con <sup>51</sup>Cr a las células efectoras a mil células/pocillo. La liberación de <sup>51</sup>Cr se midió 6 h más tarde. (**3B**) Se incubaron PBMC, células autólogas de cáncer de ovario, o PBMC más células de cáncer de ovario con o sin ESK o control de anticuerpos biespecíficos a 0,1 µg/ml durante 7 días. Se añadió <sup>3</sup>H-timidina durante la noche, y las células se recogieron al día siguiente. Los datos representan cultivos triplicados.

**La Figura 4** muestra que el anticuerpo ESK biespecífico trata efectivamente BV173 y ALL en ratones NSG. Dos millones de células BV173 se inyectaron i.v. en ratones el día 0, se confirmó el injerto tumoral el día 5 y los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento. Diez millones de células T específicas de EBV se administraron por vía intravenosa en el día 6, seguidas de 20 µg de ESK1 o inyección de control i.v. con anticuerpos biespecíficos de 4 a 5 horas más tarde. Las células T se administraron una vez a la semana y los anticuerpos biespecíficos se administraron dos veces a la semana durante un total de tres semanas. (**4A**) La carga tumoral se mostró mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI) de la parte frontal de los ratones. BLI en el día 6 mostró injerto de tumor antes del tratamiento. Los ratones que recibieron células T y anticuerpos biespecíficos de ESK mostraron una reducción significativa de la carga tumoral, especialmente en la médula ósea. (**4B**) La carga tumoral se calculó sumando la señal luminiscente de cada ratón en las dos posiciones anteriores y posteriores, y se trazó la señal promedio para cada grupo (n = 5). (**4C**) La GVHD se evaluó pesando ratones cada semana, y no se observó GVHD hasta los 49 días. (**4D**) El anticuerpo

biespecífico ESK inhibió el crecimiento primario de células de ALL en ratones NSG. Cinco millones de células de tumor primarias ALL se inyectaron i.v. en ratones NSG. El día 6, después de confirmar el injerto tumoral por BLI de luciérnaga, los ratones se dividieron aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento. Treinta millones de células T específicas de EBV se inyectaron por vía intravenosa en ratones, seguido de una inyección i.v. de 20 µg de anticuerpo biespecífico de ESK o su anticuerpo de control biespecífico. La inyección de anticuerpos biespecíficos se administró diariamente y las células T se administraron dos veces por semana durante un total de dos semanas. La inhibición del tumor en el día 18 y el día 23 después de la inoculación del tumor se muestra en vistas prona y supina para cada punto temporal. **(4E)** Datos del modelo de ratón ALL: el promedio de fotones/segundo de cinco ratones mostró una reducción de casi cien veces la carga tumoral en los ratones tratados con el anticuerpo biespecífico ESK después de más de 3 semanas.

**La Figura 5** muestra que el anticuerpo biespecífico ESK trata efectivamente la SET-2 AML en ratones NSG. En este modelo, se les dio diez millones de células T específicas para EBV i.v. dos veces a la semana y 20 µg de anticuerpos biespecíficos fueron inyectados diariamente i.v. para un total de 6 días, después de confirmar el injerto del tumor en el día de carga 4. **(5A)** del tumor se muestra desde la parte posterior de los ratones para mostrar la infiltración de leucemia columnal, con el fin de mostrar la carga de leucemia en todos los grupos. La escala BLI aumentó aproximadamente 10 veces en las imágenes desde el día 7 en adelante. **(5B)** La carga tumoral se calculó sumando la señal luminiscente de cada ratón en las dos posiciones anteriores y posteriores, y se trazó la señal promedio para cada grupo (n = 5). **(5C)** La infiltración de leucemia también se evaluó mediante la parálisis de la extremidad causada por el daño al sistema nervioso central. Los ratones que recibieron células T y anticuerpos biespecíficos de ESK no mostraron parálisis del SNC. Cada barra muestra el promedio de cinco ratones/grupo.

**La Figura 6** muestra que el anticuerpo biespecífico de ESK media la retención de células T en la médula ósea de ratones portadores de tumores. **(6A)** Veinte millones de células T específicas de EBV transducidas con Renilla se inyectaron i.v. en ratones que habían sido injertados con células SET-2. Cuatro horas más tarde, 20 µg ESK o control anticuerpo biespecífico se administra por inyección i.v.. La distribución de células T se controló mediante imágenes de bioluminiscencia de Renilla, inmediatamente después de la inyección de células T (0 h), 4 horas después de la inyección de anticuerpos biespecíficos y luego todos los días durante un total de tres días. **(6B)** La señal de las células T se calculó sumando la señal luminiscente de cada ratón y se representó la señal promedio para cada grupo (n = 3). **(6C)** La carga de leucemia SET-2 se monitorizó simultáneamente mediante imágenes de bioluminiscencia de luciérnaga en los puntos de tiempo indicados. Los ratones que recibieron células T solo no mostraron señal de luciérnaga. Los ratones que recibieron células T y el anticuerpo ESK biespecífico mostraron una reducción dramática de la carga de leucemia, en comparación con los ratones que recibieron células SET-2. La inhibición del tumor se correlacionó con la retención de células T como se muestra en la Figura 7B.

**La Figura 7** muestra que el anticuerpo ESK biespecífico elimina las células JMN del mesotelioma peritoneal en ratones NSG. Tres mil células JMN se mezclaron con seis mil células T específicas de EBV y se inyectaron por vía i.p. en ratones. Una hora más tarde, se inyectó por vía intravenosa un anticuerpo ESK o biespecífico de control y se repitió durante 5 días consecutivos. El desarrollo del tumor se monitorizó mediante imágenes de bioluminiscencia de luciérnaga en los puntos de tiempo indicados. **(7A)** El día 1 (un día después del tratamiento) no mostró un tumor visible en los ratones tratados con anticuerpos biespecíficos de ESK, lo que sugiere la eliminación de células tumorales. **(7B)** El promedio de fotones/segundo de cinco ratones mostró una reducción de casi cien veces la carga tumoral en los ratones tratados con anticuerpos biespecíficos contra ESK después de más de 3 semanas.

**La Figura 8** muestra los resultados de un análisis de unión a FACS que compara la unión del anticuerpo biespecífico ESK1-L2K con el anticuerpo biespecífico ET901 + L2K y el anticuerpo biespecífico ET901 + OKT3.

**La Figura 9** muestra los resultados de un análisis de unión a FACS que compara la unión del anticuerpo biespecífico ESK1-L2K con el anticuerpo biespecífico ET901 + L2K y el anticuerpo biespecífico ET901 + OKT3.

**La Figura 10** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 110) de una realización de un anticuerpo biespecífico que comprende un scFv que se une específicamente a WT1/HLA-A2 y un scFv que se une específicamente a CD3.

**La Figura 11A** es una PÁGINA de 1) ESK1/OKT3 (2 µg, reducido); 2) 901/OKT3 (2 µg, reducido); 3) SeeBlue Plus Pre-Stained Standard; 4) ESK1/OKT3 (2 µg, no reducido); 5) 901/OKT3 (2 µg, no reducido). **11B** muestra los estándares.

**La Figura 12** muestra la asociación y la disociación del anticuerpo monoclonal biespecífico ESK1 contra el complejo WT1/HLA-A2.

**La Figura 13** muestra los resultados de la purificación por cromatografía de intercambio catiónico de anticuerpo monoclonal biespecífico ESK1/OKT3 (**13A**) y una mezcla de ESK1 y OKT3 (**13B**).

**La Figura 14** muestra los resultados de la purificación por cromatografía de intercambio catiónico del anticuerpo monoclonal biespecífico ET901/OKT3 (**14A**) y una mezcla de 901 y OKT3 (**14B**).

**La Figura 15** muestra la unión hacia células Jurkat positivas para CD3 por FACS.

**La Figura 16** muestra los anticuerpos ESK biespecíficos que inducen la activación de células T en entornos autólogos. Las PBMC de un paciente HLA-A2 + con AML (antes de la recaída) se cocultivaron con blastos mieloides autólogos purificados de CD33+ (después de la recaída) en presencia o ausencia de ESK o anticuerpo control biespecífico a 20 µg/ml y las células se recolectaron y se tiñeron doble con CD33 para blastos (**16B**) y CD3 para células T (**16A**) el día 3 y el día 4, para evaluar el porcentaje de células T CD3 y los blastos. Las células vivas de los cultivos CD3+ (**16C**) y CD33+ (**16D**) se contaron con azul de tripano, y los números de células absolutos se obtuvieron multiplicando el porcentaje de cada población por los números de células totales.

**La Figura 17** muestra la farmacocinética de un anticuerpo ESK biespecífico. Los datos representan el promedio de 3 ratones/grupo. (**17A**) La farmacocinética del anticuerpo biespecífico de ESK se determinó mediante el uso de la construcción marcada con <sup>125</sup>I, inyectada por vía intravenosa en C57 BL6/J, o por vía intraperitoneal en ratones BALB/c, y la radioactividad de la sangre se midió durante 48-52 horas. El anticuerpo biespecífico inyectado por vía intravenosa se redistribuyó rápidamente de la sangre al tejido con una vida media alfa de 30 minutos, seguido de la depuración con una vida media beta de 5 horas. Después de la administración intraperitoneal, los niveles de anticuerpos biespecíficos aumentaron en la sangre, alcanzando un máximo de 3 horas después de la inyección. La construcción luego se aclaró con la misma vida media beta. La exposición total (área bajo la curva) de la inyección intravenosa fue mayor que con la inyección intraperitoneal. (**17B**) El patrón de biodistribución de los anticuerpos se determinó utilizando las mismas construcciones radiomarcadas. Después de 2 horas, se detectó un 3% o menos de la dosis/gramo inyectada en los tejidos principales distintos del estómago y el tracto intestinal, que elimina el yodo deshalogenado. Después de 4 horas, se detectó un 2% o menos de la dosis/gramo inyectada en los tejidos principales distintos del estómago. Después de 7 horas, se detectó un 1% o menos de la dosis/gramo inyectada en los tejidos principales que no sean el estómago.

**La Figura 18** muestra la expresión de antígenos tumorales en células de cáncer de ovario primario. (**18A**) La expresión de HLA-A2 en células de cáncer de ovario primario se midió tiñendo las células tumorales con el clon BBA,2 HLA-A2 anti-humano BB7,2 conjugado a FITC y su control de isotipo IgG2b/FITC de ratón. (**18B**) La expresión del complejo WT1 RMF/HLA-A2 en las mismas células tumorales se midió tiñendo las células con mAb ESK conjugado con APC a 3 µg/ml y su control de isotipo, IgG1/APC humana. (**18C**) La expresión de HER2-neu en las mismas células tumorales se midió tiñendo las células con Herceptin a 10 µg/ml o 1 µg/ml, seguido de mAb IgG1 antihumano de cabra conjugado con FITC. Rituximab fue utilizado como control de isotipo.

**La Figura 19** muestra el anticuerpo ESK biespecífico que induce respuestas de células T secundarias a epítomos distintos de WT1 RMF en el contexto de las moléculas HLA-A2. (**19A**) Las PBMC de un paciente con cáncer de ovario se estimularon con células tumorales autólogas en una relación efector:diana de 5:1, en presencia de un anticuerpo biespecífico ESK-bi o un anticuerpo biespecífico de control a 0,1 µg/ml. IL-5 humana (5 ng/ml) e IL-2 humana (10 unidades/ml) durante una semana y la respuesta específica del epítipo se midió mediante el ensayo elispot con IFN-g, contra células T2, pulsadas con péptidos indicados a 20 µg/ml. (**19B**) Las PBMC restantes del experimento en (A) se volvieron a estimular de la misma manera, en una relación efector/diana de 9:1, y la respuesta de las células T específicas del epítipo se midió mediante el ensayo elispot IFN-g. El mismo protocolo de estimulación y el ensayo IFN-g elispot se realizaron para comparar la respuesta de células T específica de epítipo entre (**19C**) células T CD3+ purificadas frente a PBMC agotadas de NK y macrófagos (indicado como T + B), o (**19D**) PBMC versus purificadas Células T CD3+, o células T estimuladas con células tumorales autólogas muertas. Las células tumorales muertas se generaron mediante descongelación frecuente sin DMSO. Los datos representan el promedio del cultivo de triplicado +/- DE. El sobrenadante de los co-cultivos de PBMC o células T purificadas con células autólogas de cáncer de ovario en presencia o ausencia de anticuerpos biespecíficos a 0,1 µg/ml, se recogieron después de 3 horas, 3 y 6 días e IFN-gamma (**19E**) y TNF-alfa (**19F**) se midieron mediante kits ELISA.

**La Figura 20** muestra la expresión de CD86 de la molécula coestimuladora en PBMC (**panel superior**) de un donante normal y células de cáncer de ovario de un paciente (**panel inferior**), medida mediante tinción de las células con mAb/PerCp antihumano de ratón de ratón o su control de isotipo en diferentes concentraciones. Control de isotipos: dilución 1:50, 100 y 200. Anticuerpo anti-CD86: dilución 1:50, 100 y 200.

**La Figura 21** muestra la generación de células efectoras citotóxicas de larga vida. (**21A**) Las PBMC del paciente de la Figura 19 se tiñeron con CD4, CD8, CD45RA, CD45RO y CCR7, antes y 7 semanas después

de la activación con el anticuerpo biespecífico ESK (0,1 µg/ml) en presencia de células tumorales autólogas. CD45RA y CD45RO versus CCR7 se mostraron en células T CD8 activadas. **(21B)** El gran aumento selectivo en las células T CD8 7 semanas después de la activación del anticuerpo biespecífico, medido por citometría de flujo y recuento de células. **(21C)** Las células efectoras de los experimentos que se muestran en la Figura 19 se expandieron con un suplemento semanal de IL-15 (5 ng/ml) e IL-2 (10 U/ml) durante 5 semanas, y se midió la citotoxicidad contra un tumor autólogo, SET-2 y células HL-60 mediante el ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los datos representan el promedio de los pocillos triplicados.

#### Descripción detallada de la invención

**[0026]** A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán pluralidades, y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácidos nucleicos y proteínas e hibridación descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. En la práctica de la presente invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en inmunología, que están dentro de la habilidad del artesano ordinario. Estas técnicas se describen con mayor detalle en, por ejemplo, "Current Protocols in Immunology" (John E. Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc. 1991 y actualizaciones periódicas); Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009.

**[0027]** Las siguientes abreviaturas se usan en toda la aplicación y están destinadas en general a ser interpretadas constantemente con el significado de los términos tal como se conoce en la técnica:

Ab: Anticuerpo

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

BiTE: Engendrador de células T biespecíficas

CDC: Comotoxicidad dependiente complementaria

CMC: Citotoxicidad mediada por complemento

CDR: Región determinante de complementariedad (ver también HVR abajo)

CL: Dominio constante de la cadena ligera

CH1: primer dominio constante de la cadena pesada

CH1, 2, 3: primer, segundo y tercer dominios constantes de la cadena pesada

CH2, 3: segundo y tercer dominios constantes de la cadena pesada

CHO: ovario de hámster chino

CML: leucemia mielógena crónica; también conocida como leucemia mielocítica crónica y leucemia mieloide crónica

CTL: Células T citotóxicas

Relación E:T: Efector: Relación de diana

Fab: Fragmento de unión a anticuerpo

FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia

FBS: Suero bovino fetal

FR: Región de marco de referencia

GVHD: Enfermedad de huésped versus injerto

HC: cadena pesada

HLA: antígeno leucocitario humano

HVR-H: cadena pesada de la región hipervariable (ver también CDR)

HVR-L: cadena ligera de la región hipervariable (ver también CDR)

Ig: inmunoglobulina

KD: constante de disociación

$K_{\text{apagado}}$ : Tasa de disociación

$K_{\text{encendido}}$ : Tasa de asociación

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MM: Mieloma múltiple

scFv: Fragmento variable de cadena única

$V_H$ : Cadena pesada variable incluye región hipervariable de cadena pesada y región marco variable de cadena pesada

$V_L$ : Cadena ligera variable incluye cadena ligera región de estructura variable hipervariable y cadena ligera

WT1: proteína tumoral de Wilms 1

**[0028]** En la descripción que sigue, los términos utilizados en el presente documento están destinados a ser interpretados consistentemente con el significado de esos términos como son conocidos por los expertos en la técnica. Las definiciones proporcionadas en este documento a continuación están destinadas a aclarar, pero no limitar, los términos definidos.

**[0029]** Como se usa en el presente documento, "administrar" y "administración" se refieren a la aplicación de un ingrediente activo al cuerpo de un sujeto.

**[0030]** "Anticuerpo" y "anticuerpos", como se conocen esos términos en la técnica, se refieren a proteínas de unión a antígeno del sistema inmune. El término "anticuerpo" como se menciona aquí incluye anticuerpos completos de longitud completa que tienen una región de unión a antígeno, y cualquier fragmento del mismo en el que se retiene la "porción de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno", o cadenas individuales para Ejemplo, fragmento de una sola cadena variable (scFv), del mismo. Un "anticuerpo" natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como  $V_L$ ) y una región CL constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse aún más en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera 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, incluidas varias células del sistema inmunitario (p.ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

**[0031]** El término "porción de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a esa región o parte del anticuerpo que se une al antígeno y que confiere especificidad de antígeno al anticuerpo; los fragmentos de proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, los anticuerpos incluyen uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un complejo péptido/HLA). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluidos dentro del término "fragmentos de anticuerpo" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL y CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb

(Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

**[0032]** Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite ser hecho como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Estos son conocidos como Fv de cadena única (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl Acad Sci. 85: 5879-5883. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

**[0033]** Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto o agente terapéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, o humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o clínico.

**[0034]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal.

**[0035]** La presente descripción se refiere a composiciones y métodos de tratamiento relacionados con los anticuerpos biespecíficos recombinantes. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para estimular una respuesta primaria de células T y una respuesta secundaria de células T en un sujeto que comprende administrar una composición que comprende un anticuerpo recombinante, comprendiendo dicho anticuerpo recombinante una primera porción de unión a antígeno y una segunda unión de antígeno en la que dicha primera porción de unión a antígeno se une específicamente a un primer antígeno tumoral y dicha segunda porción de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno de superficie de las células efectoras inmunitarias, en donde la respuesta de las células T principales comprende estimular las células T citotóxicas contra el primer antígeno tumoral, y en el que la respuesta secundaria de células Ts comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y/o contra un segundo antígeno tumoral. En un aspecto, el primer antígeno tumoral es WT1/HLA y el segundo antígeno tumoral es un antígeno tumoral no WT1-RMF. En un aspecto relacionado, la divulgación se refiere a un método para producir células T efectoras y/o células T de memoria contra un antígeno tumoral, opcionalmente un antígeno tumoral no WT1-RMF tal como HER2-neu. Los métodos de la presente divulgación pueden comprender además administrar una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula citotóxica tal como una célula T citotóxica CD3+. A través de la producción de células T efectoras, por ejemplo, células T citotóxicas y/o células T de memoria contra un antígeno tumoral, los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación pueden así lograr un efecto de vacunación contra células tumorales y pueden usarse para generar células para su uso en la terapia adoptiva de células T.

**[0036]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una mejora de anticuerpo anti-WT1 útil para matar células positivas WT1. El anticuerpo anti-WT1 mejorado es un anticuerpo biespecífico con una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a WT1 cuando se presenta de forma restringida a la histocompatibilidad con HLA y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de superficie celular en la superficie de una célula efectora inmune, por ejemplo, CD3 y, por lo tanto, es capaz de enganchar células efectoras inmunes, por ejemplo, células T CD3<sup>+</sup> (es decir, células T citotóxicas). En un aspecto, un anticuerpo recombinante o derivado o fragmento del mismo según la presente divulgación comprende: (i) una primera porción de unión a antígeno que comprende: (A) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende HC-CDR1, HC-CDR2 y HC-CDR3; y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, LC-CDR2 y LC-CDR3, que comprende secuencias de aminoácidos expuestas en las Tablas 1-6; (B) un VH y un VL que comprenden las secuencias de aminoácidos primera y segunda como se exponen en las Tablas 1-6; o (C) un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las Tablas 1-6; y (ii) una segunda parte de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la Tabla 7. En un aspecto, la primera parte de unión a antígeno y/o la segunda parte de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab; un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>; un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb; una CDR aislada; y un scFv.

**[0037]** En una realización, el anticuerpo biespecífico tiene una primera parte de unión con una región de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y una región de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52 o un scFv con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. Además, el anticuerpo biespecífico tiene una segunda porción de unión que comprende una región variable de la cadena ligera L2K que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 111 y una cadena pesada L2K región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112.

**[0038]** En otras realizaciones, la porción de unión a WT1/HLA del anticuerpo biespecífico anti-WT1 de la invención comprende una o más de las secuencias de aminoácidos (regiones scFv, VH y VL o CDR) enumeradas en las Tablas 1-6 u 8.

5 **[0039]** En las secuencias que siguen en las Tablas 1-7, texto en negrita indica una secuencia de enlace entre las secuencias de cadena pesada y ligera hipervariables.

10 **[0040]** En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una etiqueta de histidina para la purificación. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un péptido señal y uno o más enlazadores que comprenden residuos de glicina y serina.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



(continúa)

Antígeno	WT1		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	<p>QTVVTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNVYVYQQLPQTAPKLLIY                      RSNQRPSGVPDRFSGKSGTSASLAISGRPSVDEADYYCAAWDDSLNGV                      VFGGGTKLTVLGSRRGGGGSGGSLEMAQVLVQSGAEVKKP                      GSSVKVSKASGGTFSSYAISW/RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK                      FQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRIPPPYGGMDVWVWQ                      GTTIVTVSS                      (SEQ ID NO: 18)</p>		
ADN	<p>cagactgtgtgactcagccaccctcagcgtctgggaccocccggggcagaggggtcaccatctctgtctggaaagc                      agctccaacatcgggaagtaattatgtatactggtaaccaacagctccagggaaacggcccccacaactcctcatctata                      ggagtaatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctgggtcccaagctcggcacctcagccctccctggcca                      tcaaggggcccccgtccgtggatgagggctgattatctgtgacatgctgcagcattggatgacacccctgaaatggtgtgatt                      cggcggagggaccaaagctgaccgctcctagggtctctagagggggtggtagcggggcggcggcctctgggtg                      gfggataccctcgaatggcccaagggtcagcgtggcagctcggggctggagggtaagaaagccctgggtcctcgggt                      gaaggctcctgcaaggctctcggaggcacccttcagcagcctatgctatcagctgggtgacagagggccctgggaca                      agggcttgagtgatggggatccacagccttactatctttggtaacagcaaacctacagctgagcagcctgagggcagagt                      cacgattaccgggacgaatccacagcacaagccttactatggagctgagcagcctggggcccaaggggacacggcc                      gfgtattactgtcggagacgggattccccgggtactacgggtatgggacgtctggggcccaaggggacacgggtcacccgtc                      tectca (SEQ ID NO: 19)</p>		

**Tabla 2**

Antígeno	WT1 (Ext002 #5)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GDSVSSNSAAWN (SEQ ID NO: 20)	RTYYGSKWYNDYAVS VKS (SEQ ID NO: 21)	GRLGDAFDI (SEQ ID NO: 22)
ADN	ggggacagtgctctagcaac agfgctgctggaac (SEQ ID NO: 23)	aggacatactacgggtccaagtggt ataatgattatgcagtatctgfaaa agt (SEQ ID NO: 24)	ggfcgcttaggggatgcttttgatat c (SEQ ID NO: 25)
VL	RASQSISSYN (SEQ ID NO: 26)	AASSLOS (SEQ ID NO: 27)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 28)
ADN	cgggcaagtcagagcattag cagctattaaat (SEQ ID NO: 29)	gctgcalccagttgcaaaagt (SEQ ID NO: 30)	caacagagftacagtacccctctc act (SEQ ID NO: 31)
VH completo	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPRGLWEW LGRYYGSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFLNSVTPEDTAVY YCARGLGDAFDIWGGTMVTVSS (SEQ ID NO: 32)		
ADN	caggtaagctgcagcaggtccaggactggfgaagccctcgcagaccctcactcactcctgcccacttcc ggggacagtgctctagcaacagtgctgctggaactggatcagcagcagcccccagggagggccttgagggctg ggaaaggacatactacgggtccaagtggtataatgattatgcagtatctgfaaaagtggaataaccatcaaccag acacatccaagaaccaagttcctcagctgcaactcctgacccggagacacggctggtatctgctgcaag aggctccttaggggatgctttgatactcggggccaaggacaatggtcacccgtctctca (SEQ ID NO: 33)		
VL completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO: 34)		
ADN	gacatccagatgaccagctccatcctcctgctgcatctgtagggagacaggtaccatcacttgccgggcaa gtcagagcattagcagctatttaattggtatcagcagaaccagggaagcccctaaagctcctgctgctgca tccagttgcaaaagggtcccatcaagggtcagtgatcggcagatgggacagatttcacatcaccatcagca gtctgcaacctgaagattttgcaacttactctcaacagaggtatcagaccctctcacttctggtggagggacc aaagtgatatacaaacgt (SEQ ID NO: 35)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ex1002 #5)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYA          ASSLQSGVPSRFGSGGIDFTLLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG          TKVDIKRSRGGGGGGGGGSL<b>EMA</b>VQLQQSGPGLVKPSQTL          SLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYGSKWYNDYAVS          VKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGRLGDAFDIWQQGT          MVTVSS          (SEQ ID NO: 36)</p>		
ADN	<p>gacatccagatgaccagtcctccctctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaa          gtcagagcatttagcagctatttaaatgggtatcagcagaaccaggggaaagcccttaagctctgactatgctgca          tccagttgcaaaagtgggggtcccatcaagggtcagtgggcagtggtatctgggacagatttcacttcaccatcagca          gtcgcaacctgaaagatttggcaacttactactgtaacagagttacagtacccctctcactttcggcggagggacc          aaaatggatatcaaacg<b>ttctagaggtggtgtagcggcggcctctctggtggtggtgatccctc</b>  <b>gagatggccc</b>cagggtacagctgcagcagtcagggtccagagactgggaaagccctcgcagaccctcactcacct          gttgccatctccggggacagtgctctagcaacagctgcttggaaactggatcagggcaggtcccaccatcggagggcc          ttgagtggtctgggaaaggacatactacgggtcccaagtggtataatgattatgcatctctgtaaaaagtcaataacc          atcaaccagacacatccaaagaaccagttctccctgcagctgaactctgactcccggggacacgggctggtatt          actgtgcaagaggctcgttaggggatgcttttgatctctggggccaaagggacaatgggtcaccgtctctca (SEQ          ID NO: 37)</p>		

**Tabla 3**

Antígeno	WT1 (Ex1002 #13)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GYSFTNFWIS (SEQ ID NO: 38)	RVDPGYSYSTYSPSFQ G (SEQ ID NO: 39)	VOYSGYDWFDP (SEQ ID NO: 40)
ADN	ggatacagcttcaccaactct ggatcagc (SEQ ID NO: 41)	aggggtgatacctggctactcttata gcacctacagcccgtctctccaag gc (SEQ ID NO: 42)	gtacaatagtaggctactatgact ggttcgacccc (SEQ ID NO: 43)
VL	SGSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 44)	SNNORPS (SEQ ID NO: 45)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 46)
ADN	tctggaagcagctccaacatc ggaagtaataactgtaaac (SEQ ID NO: 47)	aglaataatacagcggccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagccctgaa tggttggttg (SEQ ID NO: 49)
VH completo	QMQLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISVVRQMPGKGLEW MGRVDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMY YCARVQYSGYDWFDPWGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)		
ADN	cagatgcagctgggtgcagtcgagcagagggaagagcccggggagctctgaggatctctgtaagggtt ctggatacagcttcaccaactctggatcagctgggctggcagatgcccgggaaaggccctggagtgatggg gagggtgatacctggctactcttatagacctacagcccgtctccaaggccacgtcaccatctagctgacaa gtctaccagactgcctaccctcagctggaacagcctgaaggcctcggacacccatgtaactctgctggagag tacaatatagtgctactatgactggttcgaccctggggccaggggaaccctgggtaccctctctca (SEQ ID NO: 51)		
VL completo	QAVVTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPKLLI YSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTASLALSISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 52)		
ADN	caggctggtgactcagccaccctcagctctgggacccccggggcagagggtcaccatctctgtctggaaag cagctccaacatcggaaagtaactgtaaacctgggtaccagcaggtcccaggaacggcccccaaacctctatct atagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccggtctctggtctcctcaggtctgacatcagctccctggg ccatcagtggtctccagctgaggtgagctgatactactgtagcagcatgggatgacagaccgtaaggtggtggg tgttcggcggaggaccagctgaccgtctctagggt (SEQ ID NO: 53)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ex002 #13)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	<p>QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVTNWNYYQQVPGTAPKLLI          YSNNQRPSGVPDRFSGSKGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN          GWVFGGGTKLTVLGSRRGGGGGGGSLMAQMLVQSGA          EVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWRQMPGKLEWGRVDPGYS          YSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKAASDTAMYYCARVQYSG          YYDWFDPWGGQLVTVSS (SEQ ID NO: 54)</p>		
ADN	<p>caggctgttgactcagcccccagctcagctcgggaccccgaggcagagggtcacatctctgttctggaag          cagctccaacatcggaaagtaactgtaacctggtaccagcagggtccaccggaacggccccaaactcctcct          ataagtaataatcagcggccctcaggggtcccctgaccgattctctggctcccaagtctggcacctcagccctccctggg          ccatcagtgggctccagctcagagatgaggtgattactgagcagcatgggcatgagccctgaatggttgggg          tgttcggcggagggaccagctgaccgctcctaggttctagaggtggtgtagcggcggcggcctcctggg          tgggtggatccctcagagatggcccagatgacagctggtgcagtccggagcagagggtgaaagagcccggggg          agtctctgaggatcctgtaagggttcctggatatacagcttcaccactctctggtatcagctggggctggccagatgccc          cgggaaaaggcctggagtgatgggggggtggtatcctggctactctctatagcaccctacagcccctcttccaag          gccacctcaccatctcagctgacaagctaccagcctgacctgagtgaaacaggccctgaaaggcctcggga          caccggccatgtattactgctgagagataatagtggtgctactatgactggtgacccctgggggcccaggggaaac          cctggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 55)</p>		

**Tabla 4**

WT1 (Ext002 #15)			
Antígeno	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
Péptido	1	2	3
CDRs:			
VH	GYNFSNKWIG (SEQ ID NO: 56)	IYPGYSDITYSPSFQG (SEQ ID NO: 57)	HTALAGFDY (SEQ ID NO: 58)
ADN	ggctacaactfttagcaacaagt ggatcggc (SEQ ID NO: 59)	atcattatccccgggtactcggacat cacctacagccccctctccaaggc (SEQ ID NO: 60)	cacacagctfttggccggctfttgact ac (SEQ ID NO: 61)
VL	RASQINIKWLA (SEQ ID NO: 62)	KASSLES (SEQ ID NO: 63)	QQYNSYAT (SEQ ID NO: 64)
ADN	Cgggcccagtcagaatatcaat aagtggtggcc (SEQ ID NO: 65)	aaggcgtctagtttiagaagt (SEQ ID NO: 66)	caacaataataatagttatggaacg (SEQ ID NO: 67)
VH completo	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFSNKWIGWVRLPGRGLEWI AIYPGYSDITYSPSFQGRVTISADTSINTAYLHWHSKASDTAMYCYCVR HTALAGFDYWGLGLTVVSS (SEQ ID NO: 68)		
ADN	caggtgcagctgggtgagctgagcagagtgtaaaaaagccggagagctctgaaagctcctgtaagggtctt ggctacaactfttagcaacaagtggtatcggctggctggcgaattgcccgggagagcctggagtgatagcaat catctatccgggtactcggacatcacctacagcccgtctcacaaggcggcaccatctccggcagacagctcc attaacaccgacctgactgacagctgacagcctgaaaggcctggacaccgccaatgattatggtgagcagacaca gcfttggccggcttgaactactggggcctggggcaccctgggtcaccctgctcctca (SEQ ID NO: 69)		
VL completo	DIQMTQSPSTLSASVGDVVTITCRASQINIKWLAWYQRPQKAPQLLIY KASSLESGVPSRFSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYQCQQYNSYATFGQ GTKVEIKR (SEQ ID NO: 70)		
ADN	gacatccagatgaccagctctccaccctgtgcatctgtaggagacagagtcacaatcacttggcggcca gtcagaataataaaggctggcctgggtatcagcagagaccaggggaaagccccctcctgctgactataagg cgtctagtttagaaaagtgggggtcccctatcagttcagcggcagtgatctgggacagaatacactctaccatcag cagcctgcagcctgatgtttgcaacttactgcccacaataataatagttatgagcagcttggcccaaggggacca aggtggaaatacaacgt (SEQ ID NO: 71)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ex002 #15)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQINIKWLAWYQQRPGKAPQLLIY          KASLESVPSRFSGSGTEYTLTISSLQDDFAYYCQQYNSYATFGQ          GTKVEIKRSRGGGGGGGGGSLMAQVQLVQSGAEVKKPGES          LKISCKGSGYNFSNKWIGVVRQLPGRGLEWIAIHPGYSIDITYSPSFQGR          VTISADTSINTAYLHWHSCLKASDTAMYCYCVRHTALAGFDYWVGLGLTLV          TVSS (SEQ ID NO: 72)</p>		
ADN	<p>gacatccagatgacccagtcctcaccctctgctgcatctgtaggagacagagtcacaatcacatctgcccgggcca          gfcagaatafcaataaagctggctggctggtatcagcagagaccaggggaaagccctcagctcctgcatctataaagg          cgtctagtttagaaaagtggggtcccactctagttcagcggcagtgatctgggacagaatafacctcaccatcag          cagcctgcaagccctgatgatttgcaccttactgcccacaataataatgattgctgacgttcggcccaggggacca          agtgggaaatcaaacgctctagaggtgggtggtagcggcggcggcctctgggtgggtggatccctcg  <b>agatggcccaggtgcagctgggtcagctctggagcagaggggaaaagcccgggagagctctgaaagatctctgt</b>  <b>aaagggtctctgtacaaacttagcaacaagtggtatcgtgggtggcccaattggcccggggagaggcctgggagtg</b>  <b>gatagcaatcatctatcccggttactcggacatcacctacagcccgtcttccaaggccgctcaccatctccgcc</b>  <b>gacagfccaataaacccctactcctgacacagcctgaaaggcctggacacccgccaatgattattgtgtgc</b>  <b>gacacacagctttggccggcttggactactggggccctgggacacctggctcctca (SEQ ID NO:</b>  <b>73)</b></p>		

**Tabla 5**

Antígeno	WT1 (Ext002 #18)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GFTFDDYGMS (SEQ ID NO: 74)	GINWNGGSTGYADS VRG (SEQ ID NO: 75)	ERGYGYHDPHDY (SEQ ID NO: 76)
ADN	gggttcacctttgatgattatgg catgagc (SEQ ID NO: 77)	gggtattaaftggaatgggtgtagc acaggttatgcagactctgtgag gggc (SEQ ID NO: 78)	gagcgtggctacgggtaccatga tccccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO: 82)
ADN	gggagaaacaacattggaagt aaaagtgtgcac (SEQ ID NO: 83)	gatgatagcgaccggccctca (SEQ ID NO: 84)	caggtgtgggatagtagtagtga tcatgtggta (SEQ ID NO: 85)
VH completo	EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGL EWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCARERGYGYHDPHDYWQGTLTVSS (SEQ ID NO: 86)		
ADN	gaagtgcagctgggtgcagctctggggaggtgtggtacggcctgggggtcctgagactcctctgtgcagc ctctgggttcacctttgatgattatggcatgagctgggtccccaagctccaggaaggggctggagtggtc tctgggtattaaftggaatgggtgtagcacaggttatgcagactctgtgaggggcccgaftcaccatccagaga caacgccaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcg agagagcgtggctacgggtaccatgatccccatgactactggggccaagccacctgggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 87)		
VL completo	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFVGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 88)		
ADN	cagctctgtctgacgcagcgcctcgggtgtcagtgccccaggaagacggccaggattacctgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccagggccagggccctgtctgtctgcta tgatgatagcagccggcctcagggatcctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccacct gaccatcagcagggctgaagccgggatgagggccactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtga tctgtgtattcggcggaggaccacagctgacctcttaggt (SEQ ID NO: 89)		
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFVGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGSLEMAEVQLVQSGG GVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWN GGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARER GYGYHDPHDYWQGTLTVSS (SEQ ID NO: 90)		

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

(continúa)

	Antígeno	WT1 (Ext002 #18)		
5	Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
	CDRs:	1	2	3
10	ADN	cagtctgtcgtgacgcagccgcctcgggtgcagtggccccaggaagacggccaggattacctgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcgtcta tgatgatagcgaccggcctcagggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccacct gaccatcagcagggtcgaagccggggatgagggccgactattactgtcaggtgtgggatagtagttagtca tgtggtattcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggt <b>ctagagggtgggtggtagcggcggcggc</b> <b>ggctctggggatccctcgagatggccgaagtcagctggtgcagctctgggggagggtgtggtacggcctg</b> 15 gggggctcctgagactctctgtgcagcctctgggffcacctttgatgattatggcatgagctgggtcggcaa gctccaggggaagggctggagtggtctctggtattaattggaatgggtagcacaggttatgcagactctg tgaggggcccattcaccatctccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctgagag ccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatccccatgactactggg 20 gccaaggcacctgtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 91)		
25				
30				
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

**Tabla 6**

WT1 (Ex1002 #23)			
Antígeno	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
Péptido	1	2	3
CDRs:			
VH	GFSVSGTYMG (SEQ ID NO. 92)	LLYSGGGTYHPASLQG (SEQ ID NO. 93)	GGAGGGHFD (SEQ ID NO. 94)
ADN	gggttcctcgcagtgccact acatgggc (SEQ ID NO. 95)	ctctttatagtggtggggcacata ccaccagcgtccctgcagggc (SEQ ID NO. 96)	gaggggcaggggtggccact tgactcc (SEQ ID NO. 97)
VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO. 98)	GNSNRPS (SEQ ID NO. 99)	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO. 100)
ADN	actgggagcagctccaacac ggggcaggtatgatgacac (SEQ ID NO. 101)	ggtaacagcaatcggccctca (SEQ ID NO. 102)	gcagcatgggatgacagcctga atggttatgctc (SEQ ID NO. 103)
VH completo	EVQLVETGGGLLQPGGSLRSCAASGFSVSGTYMGVWRQAPGKGLEW VALLYSGGGTYHPASLQGRFVSRDSSKNMYYLQMNSLKAEDTAVYY CAKGGAGGGHFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 104)		
ADN	gagggtcagctgtgtggagaccggaggctgtctccagccgggggggtccctcagactctctgtgcagcct ctgggtctcctcgtcagtgaccctacatggctgggtccgcaaggctccagggaaaggactggagtggtgca ctctttatagtggtggcgcacataccaccagcgtccctgcaggccgattcgtctccagagacagctcca agaatatggctctatctcaaatgaaatagcctgaaagccgagggacacggcgtctattactgtgcgaaaggagggg caggagggtggccacttgactctggggccaaggcaccctgggtgaccgtctctca (SEQ ID NO. 105)		
VL completo	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI YGNSNRPSGVPDFRFSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GYVFGTGKLTVLG (SEQ ID NO. 106)		
ADN	cagctgtgtgagcagccgcccagctgtgtggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactggggag cagctccaacatcggggcaggttatgatgactgtaaccagcagctccaggaacagcccccaactctcat ctatggtaacagcaatcggccctcaggggtcccctgaccgattctgtgctccaagtctggcaccctccctcctg gccatcagtggtccagctgaggatgagctgattactgtgcaagcagctgagcagcctgaatgggttatgt cttcggaactggaccagctgaccgtctaggt (SEQ ID NO. 107)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ext002 #23)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	<p>QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI                      YGNSNRPSGVPDFRSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN                      GYVFG                      TGTKLTVLGSRRGGGGGGGGGSLEMAEVQLVETGGGLLPGG                      SLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPASL                      QGRFIVSRDSSKNMVYLQMNLSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDSWG                      QGTLVTVSS (SEQ ID NO. 108)</p>		
ADN	<p>cagtcgtgttgacgcagccgcctcagtcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactggggag                      cagctccaacatcggggcaggttatgatafacactgggtaaccagcagctccaggaacagccccaaactctcat                      ctatggtaacagcaatcggccctcaggggctccagaccgattctctggctcccaagctgacacctcagccctccctg                      gccatcagtgggctccagctcagggatgagctgattattactgtcagcattgggatgacagccctgaatgggttatgt                      ctccggaactgggaccacaagctgaccctcctaggtctctaggggtggtggtagccgggctggctctgggt                      gggtgggatccccgagatggccgaggctgcagctggggagaccggggaggcttgcctccagccggggggg                      gtcctcagactcctgtgcagccctcgggtctccgctcagctgagccctcagctggctggctggctccca                      gggaagggactggagtggtcgcactctttatagtggtggcggcaccataccacccccagctccctgcaggggccg                      attcactgtccagagacagctccaagaataatgggtctatctcaaatgaatagcctgaaagccggaggacacggcc                      gtcattactgtcgaaaggaggggcaggaggggtggccactttgactctctggggccccaaaggcaccctgggtaccgt                      ctctca (SEQ ID NO. 109)</p>		

**Tabla 7**

Antígeno	CD3/L2K
5 VL completo	DDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWI YDTSKVASGVPARFSGSGSDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 111)
10 VH completo	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 112)
15 scFv	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGADDIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSK VASGVPARFSGSGSDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 113)
25 ADN sin Secuencia de señal y etiqueta his 30 35 40 45 50	caggctgtcgtgactcagcctcctctcctcctcggcaccctggccagagagtaccatctcctcctcggctcctc ctccaacatcggctccaacaccgtgaactggatcagcaggtgcccgccaccgcccccaagctcgtgactactc taacaaccagcggcctcctcggcgtgcccagcagattctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc ctc cggcggagcaccacaagctgacagtgctgggaagtagagcggcggcggatcctcctcctcctcctcctcctcctc gagggggctc cctc caagggcctggaatggatggcagagtgaccggcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc acgtgaccatcagcgcgacaagctacctcaccgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc gcatgactactgtgcccgggtgagtagcagcggcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc gtgacagtgctagtgccgggggagatccgacgtgagctggtgagagcggagctgaagtgaagaaactc gcgctcctgtaaggtgctc gcacctggacagggactggaatggatcggctacatcaacccctcccgggctacaccaactacgcccactcctg gaagggccggtcaccatcaccaccgataagtcaccagcaccgcttaccatggaactgctcctcctcctcctcctc ggacaccgctacactactattgcgcccggctactacgacgaccactactcctggactactggggacagggaa cagtgaccgtgctc atcgtgctgaccagctcaccagcaccctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc cagtcctgctcctacatgaattggtatcagcagaagcctggcaagcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc aaggtggcctc ctggaagcagagcagctgccacctactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc caaggtggaatcaag (SEQ ID NO: 114)

(continúa)

Antígeno	CD3/L2K
ADN con secuencia de señal y etiqueta de hexahistidina	atgggctggctcgtcatcactctgtttctgggtggctaccgccaccggccaggctgctgctgactcagcctccttctgct tctggcaccctggccagagagtgaccatctctgctcggctcctcctccaacatcggctccaacaccgtgaact ggtatcagcagggtgcccggcaccgcccccaagctgctgatctactcfaacaaccagcggccctcggcgtgccc gacagattctctggctctaagtccggcacctccgctccctggctatctctggcctgagctctgaggacgaggccg actactactgcgccgctgggacgattctctgaacggctgggtgctggcggaggcaccaagctgacagtgctg ggaagtagaggcgggtggcggatctgggtggcggaggatctggcggaggggctctctggaatggccagatg cagctgggtgagctctggcggcgaagtgaagagcctggcggagtcctgaggatctctgcaagggtccggcta cagctttaccaactctggatcagctgggtgagacagatgccggcaaggcctggatggatgggcagagtg accccggctactcctactccactactccccagctccaggggccacgtgacctcagcggcacaagtctact ccaccgctactcagtggaactcctgaaggctccgacaccgcatgtactactgtgcccgggtgagtagca gggctactacgattggtgacccctggggccaggggcacctctgacagtgctctagtggggggggaggtacc gacgtgagctgggtgagagcggagctgaagtgaagaaacctggcgcctcctggaaggtgctctgcaaagcta gggctatacctcaccgggtacaccatgactgggtgagcggcaggcactggacaggactggatggatgg ctacataacccctccgggtacaccaactacgagctctgtgaaggccgggtcaccatcaccaccgataa gtccaccagcaccgcttacatggaactgctcctcctgagatccgaggacaccgctactactattgcccgggtac tacgacgaccactactgctggactactggggacagggaaccacagtgaccgtgctctgaggaggcaccctc tactggatctgggggaagtgggtgctggcggcgtgacgacatcgtgctgaccagctccagccacctgtct ctgagcccaggcgagagagctaccctgctctgagagcctccagtcctgctctacatgaattggtatcagcag aagcctggcaaggcccctaagcgggtggatctacgacacctccaaggtggcctctggcgtgcccagccggtttc cggatctggctctggcaccgactactccctgacctcaacagcctggaagccgaggacgtgcccactattactg ccagcagtggtcctccaacccctgaccttggaggcggcaccagggtgaaatcaagcaccaccatcatcacc actgatag (SEQ ID NO: 115)

[0041] En una realización, el anticuerpo biespecífico de ESK1 comprende una primera porción de unión a antígeno específicamente a WT1/HLA-A2 y comprende una de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo WT1/HLA-A2 como se establece en las Tablas 1-6 y una porción de unión a antígeno que se une a CD3 y comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 7 anterior. En una realización, el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 10 (SEQ ID NO: 110). En otra realización, el anticuerpo biespecífico de ESK1 comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a WT1/HLA-A2 y comprende una de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo WT1/HLA-A2 como se muestra en la Tabla 8 y una porción de unión a antígeno que se une a OKT3 y comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 9.

Tabla 8

Antígeno	WT1		
CDRs:	1	2	3
VH	GYSTNFWIS (SEQ ID NO: 116)	RVDPGYSTYSPSFQ (SEQ ID NO: 117)	VQYSGYYDWFDP (SEQ ID NO: 118)
ADN	ggatacagctcaccactct ggatcagc (SEQ ID NO: 119)	agggtgatccggctactctatagc acctacagcccgtcctccaagc (SEQ ID NO: 120)	gtacaataatagtggtactatgact ggctcagcccc (SEQ ID NO: 121)
VL	SGSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 122)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 123)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 124)
ADN	tctggaagcagctccaacatc ggaagtaataactgtaaac (SEQ ID NO: 125)	agtaataatcagcggccctca (SEQ ID NO: 126)	gcagcatgggatgacagcctga atggttgggtg (SEQ ID NO: 127)
HC completo	<p>           QMQLVQSGAEVKEPGEISLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEW            MGRVDPGYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMY            CARVQYSGYYDWFDPWQQGLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGT            AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV            PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTCTCPCPAPELGGP            SVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN            AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK            TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES            NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA            LHNHYTQKSLSLSPGK*            (SEQ ID NO: 128)         </p>		



(continúa)

Antígeno	WT1		
	1	2	3
CDRs:			
ADN	<p>CAGGCTGTCGTGACTCAGCCCTCCTTCTGCTTCTGGCACCCCTGGCCA  GAGGTGACCACTCTCTCGCTCCGGCTCCTCTCCAACATCGGCTCCA  ACACCGTGAACCTGGTATCAGCAGGTGCCCGGCAACGCCCCCAAGCT  GCTGATCTACTTAACAACCAAGGGCCCTCCGGCGTGCCCGACAGAT  TCTCTGGCTCTAAGTCCGGCACCTCCGCCCTCCCTGGCTATCTCTGGCC  TGCACTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGCCGCTGGGACGA  TTCTCTGACGGCTGGGTGTTCCGGCGGAGGCCAACAGCTGACAGTGC  TGGGCCAGCCTAAGGCCAACCCCTACCGTGACCCCTGTCCCCCATCC  TCCGAGGAACCTGCAAGGCTAACAAAGGCCACCCCTCGTGTGCCTGATCTC  CGACTTCTACCTGGCCCGGTGACCGTGGCTGGAAAGGCTGATGGAT  CTCCTGTGAAGGCCCGGTGGAAACCAACCAAGCCCTCCAAGCAGTC  CAACAACAATAACGCCCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCTGAGC  AGTGGAAGTCCCACCGTCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGG  CTCCACCGTGGAAGAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTCTCTAG  (SEQ ID NO: 131)</p>		
scFv	<p>QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPKLLIY  SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCYCAAWDDSLNG  WVFGGGTKLTVLGSRRGGGGGGGGGSGLEMAQMQLVQSGAEV  KEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYSYST  YSPSFQGHVTVISADKSTSTAYLQWNSLKAASDTAMYCYCARVQYSGYYD  WFDPWGGTGLVTVSS  (SEQ ID NO: 132)</p>		



**Tabla 9**

Antígeno	OKT3
<p>5 10 15</p> <p>HC completo</p>	<p>QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE WIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 134)</p>
<p>20 25 30 35 40 45 50</p> <p>ADN</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGGGCGGCGTGGTGCAGCCCCGGCC GGTCCCTGCGGCTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCCGG TACACCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCGGCAAGGGCCTGGAGT GGATCGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCA GAAGTTCAAGGACCGGTTACCATCTCCCGGGACAACCTCAAGAAC ACCGCCTTCTGCAGATGGACTCCCTGCGGCGGAGGACACCGGCGT GTACTTCTGCGCCCGTACTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACT GGGGCAGGGCACCCCGTGACCGTGTCTCCGCTCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTGCGTGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACG ACCTGAACCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAT GA (SEQ ID NO: 135)</p>

(continúa)

Antígeno	OKT3
LC completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSVSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 136)
ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGG CGACCGGGTGACCATCACCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGTCTACA TGAAGTGGTACCAGCAGACCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCGGTGGAT CTACGACACCTCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGGTTCTCCG GCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCTTACCATCTCCTCCCTGCAG CCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCC CTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCCGGACCGTGG CCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCTCCGACGAGCAGTGAAG TCCGGCACCGCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCTCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGC AACTCCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCT ACTCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCTCCCC CGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGCTAG (SEQ ID NO: 137)

**[0042]** Los anticuerpos biespecíficos recombinantes de la presente descripción también incluyen polipéptidos sustancialmente homólogos que tienen porciones de unión a antígeno que son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% idénticos a los péptidos descritos en las Tablas 1-9.

**[0043]** Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden producirse en sistemas de expresión recombinante, utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Algunas de las técnicas implican aislar un ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica (o parte de la misma) de un anticuerpo de interés, y manipular el ácido nucleico a través de tecnología de ADN recombinante. El ácido nucleico puede fusionarse con otro ácido nucleico de interés o alterarse (por ejemplo, mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para agregar, eliminar o sustituir uno o más residuos de aminoácidos.

**[0044]** Cualquier sistema de expresión conocido en la técnica puede ser utilizado para hacer los anticuerpos biespecíficos recombinantes de la presente divulgación. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido deseado. Entre las células huésped que pueden emplearse se encuentran procariontes, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariontes incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL. 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular CVI (ATCC CCL 70) de riñón de mono verde como se describe por McMahan et al. al., 1991, EMBO J. 10: 2821. Los vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos se describen en la técnica, por ejemplo, por Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, NY, 1985.

**[0045]** Las células transformadas pueden ser cultivadas en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, y el polipéptido recuperados por procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Uno de tales procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, sobre una matriz que tiene todo o una porción del antígeno unido a la misma. Los polipéptidos contemplados para su uso en el presente documento incluyen anticuerpos biespecíficos recombinantes sustancialmente homogéneos sustancialmente libres de

materiales endógenos contaminantes.

**[0046]** En un aspecto, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente descripción se producen a partir de células anfitrionas transformadas con un vector de expresión recombinante que codifica un péptido que tiene una primera porción de unión a antígeno y una segunda porción de unión a antígeno. En otro aspecto, un anticuerpo biespecífico de la presente divulgación se produce a partir de dos anticuerpos separados, es decir, un anticuerpo que tiene una primera porción de unión a antígeno y un anticuerpo que tiene una segunda porción de unión a antígeno, que están vinculados, por ejemplo, utilizando enlaces disulfuro.

**[0047]** La secuencia de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos descritos en este documento puede ser verificada por cualquier medio conocido en la técnica, y puede ser idéntica a las secuencias descritas en el presente documento en las Tablas 1-9, o pueden diferir de aquellas secuencias en uno o más residuos de aminoácidos como resultado del procesamiento. Por ejemplo, en la totalidad o en una porción de los anticuerpos biespecíficos sustancialmente homogéneos, un aminoácido C-terminal de la cadena ligera o de la cadena pesada (o molécula de cadena única relevante) puede eliminarse mediante procesamiento proteolítico u otro procesamiento eso ocurre durante el cultivo, por ejemplo, el procesamiento de residuos Lys C-terminales. Alternativamente, se puede eliminar más de un residuo de aminoácido C-terminal, por ejemplo, dos aminoácidos C-terminales, o tres, cuatro o cinco aminoácidos C-terminales. De manera similar, los aminoácidos N-terminales pueden estar ausentes, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales pueden estar ausentes.

**[0048]** Alternativamente, o adicionalmente, los anticuerpos biespecíficos pueden someterse a modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, pero no limitado a, una glutamina se pueden ciclar o convertirse a ácido piroglutámico; Adicional o alternativamente, los aminoácidos pueden sufrir desamidación, isomerización, glicación y/u oxidación. Los polipéptidos de la invención pueden sufrir modificaciones postraduccionales adicionales, que incluyen glicosilación, por ejemplo, glicosilación ligada a N o ligada a O, en sitios que son bien conocidos en la técnica. Como se describió anteriormente, se pueden hacer cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para evitar o minimizar tales alteraciones, o para facilitarlas en circunstancias en las que tal procesamiento es beneficioso.

**[0049]** Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación incluyen polipéptidos que se han modificado de alguna manera y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alterar las afinidades de unión, y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Además, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) realizadas en una secuencia descrita en cualquiera de las Tablas 1-9 (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del dominio o los dominios que forman contactos intermoleculares) están abarcadas por la presente divulgación. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) también se puede usar, por ejemplo, para generar péptidos más estables. Además, las secuencias de consenso se pueden usar para seleccionar residuos de aminoácidos para la sustitución; los expertos en la técnica reconocen que también pueden sustituirse residuos de aminoácidos adicionales. Los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)).

**[0050]** Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de la cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa- o lambda. La región constante de la cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu. En un aspecto, la región constante de la cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante que ocurre naturalmente.

**[0051]** En otro aspecto, la divulgación se refiere a un derivado o análogo de un anticuerpo biespecífico de la presente divulgación. Un derivado puede comprender cualquier molécula o sustancia que imparta una propiedad deseada, como una mayor vida media en un uso particular. Los ejemplos de moléculas que se pueden usar para formar un derivado incluyen, pero no se limitan a, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano) y polietilenglicol (PEG). Los derivados tales como los derivados de anticuerpos unidos a albúmina y PEGilados pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Un análogo puede ser un análogo no peptídico de un anticuerpo biespecífico descrito aquí. Los análogos no peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos", véase, por ejemplo, Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Frei Dinger TINS p. 392 (1985); y Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$

, y  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , por métodos bien conocidos en la técnica.

**[0052]** En un aspecto, un anticuerpo biespecífico recombinante de acuerdo con la presente descripción comprende: (i) una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: (A) un scFV que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, 108 y 132; o (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: (i) 14 y 16; (ii) 32 y 34; (iii) 50 y 52; (iv) 68 y 70; (v) 86 y 88; (vi) 104 y 106; y (vii) 128 y 130; o (C) (i) las siguientes tres regiones determinantes de complementariedad de VH (CDR): (a) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56, 74, 92 y 116; y (b) una VH CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 21, 39, 57, 75, 93 y 117; y (c) una VL CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 22, 40, 58, 76, 94 y 118; y (ii) las siguientes tres VL CDR: (a) una VL CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 26, 44, 62, 80, 98 y 122; y (b) una VL CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 27, 45, 63, 81, 99 y 123; y (c) una VL CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 28, 46, 64, 82, 100 y 124; y (II) una segunda parte de unión a antígeno que comprende (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113; o (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde VH y VL, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NOS: 112 y 111 o la SEQ ID NOS: 134 y 136.

**[0053]** En un aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 16; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

**[0054]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34; o (C) una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28.

**[0055]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: scFV (A) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 54; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 50 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 52; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 40; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 45; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 46.

**[0056]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: scFV (A) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 72; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 70; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 56; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64.

**[0057]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: scFV (A) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 90; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 88; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 74; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75; una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 76; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82.

**[0058]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: scFV (A) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 108; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 106; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 92; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 94; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 99; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 100.

**[0059]** En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende uno de: scFV (A) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 132; o (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 128 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 130; o (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 117; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 118; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 122; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 123; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 124.

**[0060]** En un aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de una secuencia de VH y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de una secuencia VL en cualquiera de las Tablas 1-6 u 8. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 50 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 52. En otro aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de una secuencia VH en cualquiera de las Tablas 1-6 u 8 que es al menos el 90% idéntica a esa secuencia VH y/o comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de una secuencia VL en esa misma Tabla que es al menos 90% idéntica a esa secuencia VL. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 50 que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 50 y/o comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 52 que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 52.

**[0061]** En otro aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una segunda parte de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de una secuencia de VH y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 de una secuencia VL en la Tabla 7 o la Tabla 9. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 111 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 111. En otro aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de una secuencia VH en la Tabla 7 o la Tabla 9 que es al menos 90% idéntica a esa secuencia VH y/o comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de una secuencia VL en esa misma Tabla que es al menos 90% idéntica a esa secuencia VL. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 112 que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 112 y/o comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 111 que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 111.

**[0062]** En un aspecto, la primera porción de unión al antígeno y/o segunda porción de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico de la presente descripción son scFv. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico según la presente invención comprende una primera porción de unión a antígeno que comprende un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108 o 132 y/o una segunda parte de unión a antígeno que comprende un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113. En otro aspecto, un anticuerpo biespecífico según la presente invención comprende una primera parte de unión a antígeno que comprende las seis CDR (VH CDR1, CDR2 y CDR3 y VL CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108 o 132 y es al menos 90% idéntica a esa secuencia de scFV y/o

comprende una segunda porción de unión a antígeno que comprende las seis CDR (VH CDR1, CDR2 y CDR3 y VL CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 113 y está en al menos 90% idéntica a esa secuencia scFV.

5 **[0063]** En un aspecto, la primera porción de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico recombinante de la presente descripción se une específicamente a WT1 HLA y la segunda porción de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula efectora inmune. En otro aspecto, la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en células asesinas naturales (NK), macrófagos, células T y combinaciones de las mismas. En otro aspecto, la célula efectora inmune es una célula CD3+. En un aspecto adicional, el anticuerpo recombinante se une específicamente a CD3. En un aspecto, el anticuerpo recombinante se une a una célula WT1-HLA2+, por ejemplo, una célula WT1/HLA2+ que tiene una baja densidad de WT1/HLA2 en su superficie.

10 **[0064]** En un aspecto, la descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante descrito en el presente documento. En un aspecto relacionado, una célula huésped se transforma con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la presente descripción. En un aspecto, el ácido nucleico comprende una secuencia de ADN expuesta en cualquiera de las Tablas 1-9.

15 **[0065]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en el presente documento y un diluyente fisiológicamente aceptable, excipiente, o portador. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo, un agente contra el cáncer, un adyuvante u otra sustancia inmunestimulante, una sustancia anti-angiogénica, una sustancia analgésica, etc. En varias realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de un anticuerpo biespecífico recombinante.

20 **[0066]** En un aspecto, una composición farmacéutica de la presente divulgación comprende un anticuerpo recombinante descrito en el presente documento con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste de un tampón, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tales como aquellos con menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tal como glucosa, sacarosa o dextrina, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizador y un excipiente. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica son ejemplos de diluyentes apropiados. De acuerdo con los estándares apropiados de la industria, también se pueden agregar conservantes como el alcohol bencílico. Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; tampones y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. Una preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Se prefiere el uso de solución salina fisiológica, y una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril. En un aspecto, la composición puede formularse como un liofilizado usando soluciones de excipientes apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Otros ejemplos de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición. (1980) y 20ª Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, Pa.

25 **[0067]** Tal como se entiende en la técnica, las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación se administran a un sujeto de una manera apropiada a la indicación. Una composición farmacéutica de la presente descripción que comprende un anticuerpo recombinante descrito en el presente documento puede formularse para administrarse por cualquier vía que proporcione una dosis eficaz del anticuerpo biespecífico. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier técnica adecuada, que incluye, entre otras, la parenteral, tópica o por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, por vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, mediante inyección en bolo o infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio del tumor, como la administración transdérmica y la liberación sostenida de los implantes. El suministro por inhalación incluye, por ejemplo, inhalación nasal u oral, uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol, y similares. Otras alternativas incluyen gotas para los ojos; preparaciones orales que incluyen tabletas, cápsulas, jarabes, pastillas o chicles; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, aerosoles, parches y ungüentos.

30 **[0068]** En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para matar una célula positiva para WT1 comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en el presente documento y una célula efectora inmune. La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad positiva para WT1 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo recombinante biespecífico descrito en el presente documento. En un aspecto, el método comprende además administrar al sujeto una célula efectora inmune. En un aspecto, la célula efectora inmune es una célula citotóxica, por ejemplo, una célula asesina natural, macrófago o célula T. En un aspecto, las células T citotóxicas son una célula T citotóxica CD3+, opcionalmente, una célula T autóloga. En un aspecto, la enfermedad positiva para WT1 es leucemia (crónica o aguda) o un cáncer positivo para WT1. Los ejemplos de cánceres positivos para WT1 incluyen,

pero no se limitan a, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple (MM), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda/mielógena (LMA), síndrome mielodisoplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cánceres gastrointestinales, cáncer de mama, cáncer de próstata y glioblastoma.

5 **[0069]** La presente descripción se refiere por tanto a un método de tratamiento de un cáncer que comprende  
 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o composición recombinante descritos en el  
 presente documento a un paciente en necesidad del mismo. En un aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que  
 consiste en cáncer suprarrenal, carcinoma de células acínicas, neuroma acústico, melanoma lentiginoso acral,  
 10 acrospiroma, leucemia eosinofílica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia  
 megocarioblástica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia promielocítica, adenocarcinoma, carcinoma adenoide  
 quístico, adenoma, tumor odontogénico adenomatoide, carcinoma adenoescamoso, neoplasia del tejido adiposo,  
 carcinoma adrenocortical, leucemia/linfoma de células T en adultos, leucemia agresiva de células NK, linfoma  
 15 relacionado con el SIDA, rabdomiosarcoma alveolar, sarcoma alveolar de partes blandas, fibroma ameloblastico,  
 linfoma anaplásico de células grandes, cáncer de tiroides anaplásico, linfoma angioinmunoblástico de células T,  
 angiomiolipoma, angiosarcoma, astrocitoma, tumor rabdoide teratoide atípico, leucemia linfocítica crónica de células B,  
 leucemia prolinfocítica de células B, linfoma de células B, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar, cáncer  
 de vejiga, blastoma, cáncer de huesos, tumor de Brenner, tumor de Brown, linfoma de Burkitt, cáncer de mama, cáncer  
 20 de cerebro, carcinoma, carcinoma in situ, carcinosarcoma, tumor de cartílago, cementoma, sarcoma mieloide,  
 condroma, cordoma, coriocarcinoma, papiloma del plexo coroideo, sarcoma de células claras del riñón,  
 craneofarinigioma, linfoma cutáneo de células T, cáncer de cérvix, cáncer de colon, cáncer colorrectal, enfermedad de  
 Degos, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, linfoma difuso de células B grandes, tumor neuroepitelial  
 disembrionial, disgerminoma, carcinoma embrionario, neoplasma de la glándula endocrina, tumor del seno  
 25 endodérmico, linfoma de células T asociado a enteropatía, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, feto in fetu, fibroma,  
 fibrosarcoma, linfoma folicular, cáncer folicular de tiroides, ganglioneuroma, cáncer gastrointestinal, tumor de células  
 germinales, coriocarcinoma gestacional, fibroblastinoma de células gigantes, tumor de células gigantes del hueso,  
 tumor glial, glioblastoma, glioma, gliomatosis cerebral, glucagonoma, gonadoblastoma, tumor de células de la  
 granulosa, ginandroblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, leucemia de células pilosas,  
 hemangioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, hemangiopericitoma, neoplasia hematológica, hepatoblastoma, linfoma  
 30 hepatoesplénico de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, carcinoma lobular invasivo, cáncer del intestino,  
 cáncer del riñón, cáncer laríngeo, lentigo maligno, carcinoma letal de la línea media, leucemia, tumor de células de  
 Leydig, liposarcoma, cáncer de pulmón, linfangioma, linfangiosarcoma, linfoepitelioma, linfoma, leucemia linfocítica  
 aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica crónica, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma  
 de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma MALT, histiocitoma fibroso maligno, tumor  
 35 maligno de la vaina del nervio periférico, tumor maligno del tritón, linfoma de células del manto, linfoma de células  
 marginales de zona B, leucemia de mastocitos, tumor mediastinal de células germinales, carcinoma medular del seno,  
 el cáncer medular de tiroides, el meduloblastoma, el melanoma, el meningioma, el cáncer de células de merkel, el  
 mesotelioma, el carcinoma urotelial metastásico, el tumor mulleriano mixto, el tumor mucinoso, el mieloma múltiple, el  
 mieloma múltiple, neoplasma del tejido musculoso, micosis fungoides, mixoide liposarcoma, mixoma, mixosarcoma,  
 carcinoma nasofaríngeo, neurinoma, neuroblastoma, neurofibroma, neuroma, melanoma nodular, cáncer ocular,  
 40 oligoastrocitoma, oligodendroglioma, oncocitoma, meningioma de la vaina del nervio óptico, tumor del nervio óptico,  
 cáncer oral, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de papilo, cáncer de papiota pineocitoma, pituitoma, adenoma  
 hipofisario, tumor hipofisario, citoma plasmático, poliembrioma, linfoma linfoblástico T precursor, linfoma primario del  
 sistema nervioso central, linfoma por efusión primaria, cáncer peritoneal prematuro, cáncer de próstata, cáncer de  
 45 páncreas, cáncer de faringe, pseudomixoma peritoneal, carcinoma de células renales, carcinoma medular renal,  
 retinoblastoma, rabdomioma, rabdomiosarcoma, transformación de Richter, cáncer del recto, sarcoma,  
 Schwannomatosis, seminoma, tumor de células de Sertoli, tumor de estroma gonadal del cordón sexual, carcinoma  
 de células en anillo de sello, cáncer de piel, tumores pequeños de células redondas azules, carcinoma de células  
 pequeñas, sarcoma de tejido blando, somatostatina, verruga, tumor columnal, linfoma esplénico de la zona  
 50 marginal, carcinoma de células escamosas, sarcoma sinovial, enfermedad de Sezary, cáncer de intestino delgado,  
 carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, linfoma de células T, cáncer de testículo, cáncer de tiroides,  
 carcinoma de células de transición, garganta cáncer, cáncer de uraco, cáncer urogenital, carcinoma urotelial,  
 melanoma uveal, cáncer uterino, carcinoma verrugoso, glioma de la vía visual, cáncer vulvar, cáncer vaginal,  
 macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Warthin y tumor de Wilms.

55 **[0070]** En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para estimular una respuesta primaria de células T y una  
 respuesta secundaria de células T en un sujeto que comprende la administración de una composición que comprende  
 un anticuerpo recombinante, dicho anticuerpo recombinante que comprende una primera porción de unión a antígeno  
 y segunda porción de unión al antígeno, en donde dicha primera porción de unión al antígeno se une específicamente  
 60 a un primer antígeno tumoral y dicha segunda porción de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno de  
 superficie de las células efectoras inmunes, en donde la respuesta primaria de las células T comprende estimular las  
 células T citotóxicas contra el primer antígeno tumoral, y en el que la respuesta secundaria de células Ts comprende  
 estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y/o contra un segundo  
 antígeno tumoral. En un aspecto, el primer antígeno tumoral es WT1-HLA y el segundo antígeno tumoral es un  
 antígeno tumoral no WT1/RMF. Los ejemplos de antígenos tumorales no WT1/RMF incluyen, pero no se limitan a,  
 65 HER2-neu, mesotelina, Terc, Muc 16, MuC1, PSMA y otros conocidos en la técnica (Cheever et al. Clinical cancer  
 research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009; 15 (17): 5323-37). En un aspecto,

la respuesta primaria de las células T y/o la respuesta secundaria de las células T comprende un aumento de las células T en un sitio del tumor, por ejemplo, médula ósea, pulmón, hígado, cerebro, tracto genitourinario, tracto gastrointestinal y/o bazo.

5 **[0071]** En un aspecto, la respuesta secundaria de células T comprende la estimulación de las células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y un segundo antígeno tumoral. En otro aspecto, la respuesta secundaria de las células T comprende estimular células T efectoras contra el segundo antígeno tumoral y no contra el primer antígeno tumoral. En un aspecto, la respuesta secundaria de las células T no requiere células presentadoras de antígenos (es decir, presentación cruzada) o moléculas coestimulantes como CD86 o ligando coestimulador inducible (ICOSL). En otro aspecto, la respuesta secundaria de las células T comprende un aumento en las células T CD8. En un aspecto relacionado, la respuesta secundaria de las células T es de larga duración, por ejemplo, que dura más de una semana, más de dos semanas, más de tres semanas, más de un mes o más de dos meses. En un aspecto, la respuesta secundaria de las células T comprende células T que antes eran anérgicas.

15 **[0072]** En un aspecto, un método para estimular una respuesta primaria de células T y una respuesta secundaria de células T de acuerdo con la presente divulgación comprende la administración de una composición que comprende un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 110. En otro aspecto, el método comprende administrar un anticuerpo biespecífico que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a WT1/HLA y la respuesta secundaria de las células T comprende células T previamente activadas con un antígeno no WT1-RMF.

25 **[0073]** En un aspecto, la respuesta primaria de células T y/o respuesta secundaria de células T ocurre *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico descrito en este documento puede administrarse a un paciente que lo necesite en una cantidad eficaz para estimular una respuesta primaria de células T contra WT1/HLA y una respuesta secundaria de células T contra un antígeno tumoral no WT1-RMF. En otro aspecto, la respuesta primaria de las células T y/o la respuesta secundaria de las células T se produce *ex vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico según la presente divulgación se puede administrar a células *in vitro* para activar y expandir una población de células T que tienen especificidad por un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral no WT1-RMF. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T puede administrarse a un sujeto que la necesite, por ejemplo, de forma autóloga, para tratar el cáncer.

35 **[0074]** Sin pretender imponer ninguna teoría, la respuesta primaria de las células T y/o secundaria de las células T puede resultar de la capacidad del anticuerpo biespecífico de llevar un TCR de una célula T lo suficientemente cerca de una célula tumoral para reconocer MHC/péptidos epítomos directamente en el tumor. En un aspecto, la unión de la primera porción de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico a un primer antígeno tumoral, por ejemplo, WT1/HLA, durante la fase de estimulación de células T puede bloquear el reconocimiento del primer antígeno tumoral del TCR afín de células T, lo que resulta en una respuesta secundaria de células T específica para un antígeno tumoral distinto del primer antígeno tumoral.

40 **[0075]** La presente descripción se refiere por tanto a un método de producción de las células T efectoras y/o células T de memoria contra un antígeno tumoral que comprende la activación de una célula T con el anticuerpo recombinante descrito en el presente documento. En un aspecto, dichas células T producidas después de la activación son viables durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes o al menos dos meses. En un aspecto, el anticuerpo recombinante comprende una primera parte de unión a antígeno que se une a WT1/HLA, pero las células T efectoras y/o células T de memoria producidas están contra un antígeno tumoral no WT1-RMF, por ejemplo, HER2-neu, mesotelin, Terc, Muc 16, MuC1, PSMA, y otros conocidos en la técnica. En un aspecto, las células T efectoras y/o las células T de memoria se producen *in vivo*. En otro aspecto, las células T efectoras y/o las células T de memoria se producen *ex vivo*, por ejemplo, para uso en terapia adoptiva de células T. En un aspecto, la administración de un anticuerpo biespecífico aumenta la producción de células T CD8, dando como resultado una memoria efectora de larga duración. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación que tienen una primera porción de unión específica para WT1/HLA son, por lo tanto, capaces de inducir una respuesta vacunal contra antígenos tumorales no WT1, dando como resultado una terapia antitumoral amplia y eficaz.

55 **[0076]** Los métodos de tratamiento de la presente descripción abarcan la mitigación o la prevención de al menos un síntoma o de otro aspecto de un trastorno, o la reducción de la gravedad de la enfermedad, y similares. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico recombinante o una composición farmacéutica de la invención es una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células positivas para WT1, reducir el tamaño/carga tumoral, prevenir la metástasis/infiltración de células tumorales y/o dar lugar a la muerte celular, por ejemplo, a través de la apoptosis o necrosis. En otro aspecto, un método que comprende administrar profilácticamente un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, para inducir una respuesta secundaria de células T y producir células T de memoria, es eficaz para prevenir la aparición o recurrencia o para reducir la gravedad de una enfermedad. Un anticuerpo biespecífico o una composición farmacéutica descrita en este documento no necesita efectuar una cura completa, o erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en la técnica, los agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado de enfermedad dado, pero

no es necesario que se eliminen todas las manifestaciones de la enfermedad para que se consideren útiles. De manera similar, un tratamiento administrado profilácticamente no necesita ser completamente efectivo para prevenir la aparición de una afección para constituir un agente profiláctico viable. Simplemente reduciendo el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentando la efectividad de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reduciendo la probabilidad de que la enfermedad ocurra o empeore en un sujeto, es suficiente.

[0077] Las dosis y la frecuencia de administración para uso en los métodos de la presente divulgación pueden variar de acuerdo con factores tales como la vía de administración, los anticuerpos biespecíficos particulares empleados, la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar, ya sea la afección es aguda o crónica, y el tamaño y la condición general del sujeto. Las dosis apropiadas se pueden determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, en ensayos clínicos que pueden incluir estudios de aumento de dosis.

[0078] Un anticuerpo biespecífico recombinante de la presente divulgación puede administrarse, por ejemplo, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares durante un período de tiempo. En general, el anticuerpo recombinante o la composición farmacéutica se administra a un sujeto hasta que el sujeto manifiesta un grado de mejora médicamente relevante sobre la línea de base para el indicador o indicadores elegidos.

[0079] En general, la cantidad de un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en el presente documento presente en una dosis, o producida *in situ* por un polinucleótido que codifica presente en una dosis, varía de aproximadamente 10 µg por kg a aproximadamente 20 mg por kg de anfitrión. Generalmente se prefiere el uso de la dosis mínima que sea suficiente para proporcionar una terapia eficaz. En general, los pacientes pueden ser monitoreados para determinar su efectividad terapéutica o profiláctica usando ensayos adecuados para la afección que se está tratando o previniendo; los ensayos serán familiares para los expertos en la técnica y algunos se describen en el presente documento.

[0080] Los métodos descritos en este documento pueden incluir la administración oral de anticuerpo biespecífico descrito en este documento o la administración por inyección de una composición farmacéutica líquida. Cuando se administra en forma líquida, los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del sujeto, pero típicamente oscilarán entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 500 ml (comprendiendo entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 1000 µg por kg) para un sujeto de 10-60 kg. Las dosis óptimas generalmente se pueden determinar utilizando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la masa corporal, el área corporal, el peso o el volumen de sangre del sujeto. Como se describe en el presente documento, la dosis apropiada también puede depender de la condición del paciente, es decir, el estadio de la enfermedad, el estado general de salud, la edad, el sexo, el peso y otros factores familiares para un experto en la técnica médica.

[0081] En realizaciones particulares de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto es un ser humano o animal no humano. Un sujeto que necesite los tratamientos descritos en el presente documento puede presentar síntomas o secuelas de una enfermedad, trastorno o afección descritos en el presente documento o puede estar en riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o afección. Los animales no humanos que pueden tratarse incluyen mamíferos, por ejemplo, primates no humanos (por ejemplo, monos, chimpancés, gorilas), roedores (por ejemplo, ratas, ratones, jerbos, hámsters, hurones, conejos), lagomorfos, cerdos (por ejemplo, cerdos, cerdos en miniatura), equinos, caninos, felinos, bovinos y otros animales domésticos de granja y zoológicos.

[0082] La presente descripción se entenderá más fácilmente por referencia al siguiente Ejemplo, que se proporciona a modo de ilustración y no se pretende que sea limitante.

#### Ejemplo

#### **Materiales y métodos**

[0083] **Muestras celulares, líneas celulares y anticuerpos.** Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos de tipo HLA y pacientes se obtuvieron mediante centrifugación de densidad Ficoll. Las fuentes para obtener leucemia humana y líneas celulares de tumores sólidos se describieron anteriormente (Dao et al., *Supra*). Las líneas celulares para este estudio incluyeron: líneas AML HL60, SET-2, línea Ph+ ALL BV173, líneas celulares de mesotelioma JMN y MSTO. Todas las células fueron tipificadas por HLA. Las líneas celulares se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 5% de FCS, penicilina, estreptomina, 2 mmol/L de glutamina, y 2-mercaptoetanol a 37 C/5% de CO<sub>2</sub>. Las células tumorales para todos los estudios en animales se transdujeron con GFP/luciferasa como se describió anteriormente (Dao et al., *Supra*). ESK1 y su IgG1 humana de control fueron producidos por Eureka Therapeutics Inc. (Emeryville, CA) y la conjugación de APC se realizó de acuerdo con las instrucciones de la fabricación (Dao et al., *Supra*). El anticuerpo monoclonal (mAb) contra HLA-A2 humano (clon BB7,2) conjugado a FITC o APC, y su isotipo de control de ratón IgG2b/FITC o APC se adquirieron de BD Biosciences (San Diego, CA). Los mAb anti-His de etiqueta de ratón conjugados con FITC o PE y los kits ELISA para IFN-γ humanos se adquirieron de Invitrogen, (NY). El sustrato de luciferasa de Renilla, ViviRen™, se compró a Promega (Madison, WI).

[0084] **Péptidos.** Todos los péptidos fueron comprados y sintetizados por Genemed Synthesis, Inc. (San Antonio, TX).

Secuencias de aminoácidos para HER2-neu-369-377: KIFGSLAFL (SEQ ID NO: 138); p53 264-272: LFEVRVCAC (SEQ ID NO: 139); WT1: RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1); Prame-300: ALYVDSLFFL (SEQ ID NO: 140); p435: NLTHVLYPV (SEQ ID NO: 141). WT1-NQM, AILDF, LDF y el total de péptidos combinados se describieron anteriormente (Dobrovina et al. Blood. 2012 Aug 23; 120 (8): 1633-46). El péptido de unión a HLA-A2 de control se derivó del sarcoma de Ewing: QLQNPSYDK (SEQ ID NO: 142).

**[0085] Construcción, expresión y purificación de anticuerpos específicos contra ESK-Bi.** En una realización, el anticuerpo biespecífico de una ESK1 es una sola cadena de anticuerpo biespecífico que comprende ESK1 scFv en el extremo N-terminal y un CD3 $\epsilon$  scFv anti-humano de un anticuerpo monoclonal de ratón en el extremo C-terminal (Figura 10). GeneArt (Invitrogen) sintetizó los fragmentos de ADN que codifican el anticuerpo scFv de ESK1 y el anticuerpo CD3 $\epsilon$  scFv antihumano y se subclonaron en el vector de expresión pGSN-Hyg de mamíferos de Eureka utilizando tecnología estándar de ADN. Se insertó una etiqueta de hexahistidina (His) corriente abajo del anticuerpo biespecífico de ESK1 en el extremo C-terminal para la purificación y detección de anticuerpos.

**[0086]** Las células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectaron con el vector de expresión de anticuerpo biespecífico ESK1 y la expresión estable se logró mediante la selección de medicamentos estándar con metionina sulfoximina (MSX), un método basado en glutamina sintetasa (GS) (Fan, et al. Biotechnology Bioengineering. 109 (4), 1007-1005 (2012)). Se recogieron sobrenadantes de células CHO que contenían moléculas de anticuerpo bi-específico ESK1 secretadas. El anticuerpo biespecífico ESK1 se purificó utilizando la columna HisTrap HP (GE healthcare) mediante el sistema FPLC AKTA. Brevemente, el cultivo de células CHO se clarificó y se cargó en la columna con baja concentración de imidazol (20 mM), y luego se usó un tampón de elución isocrático con alta concentración de imidazol (500 mM) para eluir la proteína de anticuerpo biespecífico de ESK1 unido. Se construyó un anticuerpo biespecífico de control negativo a partir de un anticuerpo IgG1 humano irrelevante (Cat N° ET901, Eureka Therapeutics) que reemplaza ESK1 scFv.

**[0087] Análisis de citometría de flujo.** Para la tinción de anticuerpos biespecíficos de ESK, se incubaron células T humanas, células tumorales o líneas celulares con diferentes concentraciones de anticuerpos biespecíficos de ESK o anticuerpos de control biespecíficos durante 30 minutos en hielo, se lavaron y se incubaron con mAbs secundarios contra etiqueta His. La expresión de HER2-neu en células de cáncer de ovario primario se midió tiñendo las células tumorales con Trastuzumab, seguido de IgG de cabra anti-humana secundaria. La expresión de HLA-A2 y la unión de ESK se determinaron mediante tinción directa de las células con los mAbs respectivos. El fenotipo de PBMC o células T de muestras de pacientes se caracterizó por la tinción directa de las células con mAbs para CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RO, CCR7, CD19 o CD33 conjugados con diversos fluoróforos. Los datos de citometría de flujo se recopilaron en un FACS Calibur (Becton Dickinson) y se analizaron con el software FlowJo V8.7.1 y 9.4.8.

**[0088]** Un estudio de unión se realizó para examinar anticuerpo biespecífico ESK1+ L2K de unión a células Jurkat (una línea celular humana de cáncer CD3<sup>+</sup>). Brevemente, se añadió anticuerpo biespecífico en dilución en serie 3x, a partir de 10  $\mu$ g/ml a 0,5 x 10<sup>6</sup> células Jurkat. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-etiqueta conjugado con FITC (Thermo N° MA1-81891) a una dilución de 100x o un anticuerpo anti-His de ratón con o sin alofococianina (APC)-IgG de ratón (Biolegend N° Poli4053) a una dilución de 1000x y se analizaron mediante citometría de flujo en un Guava EasyCyte 6HT (EMD Millipore). Los resultados se muestran en la Figura 8.

**[0089]** A continuación, utilizando anticuerpos ESK1+ L2K, ET901 + L2K y ET901 + OKT3 a 10  $\mu$ g/ml, se examinó la tinción de las células Jurkat por FITC anti-His. Se usaron FITC ET901 y APC ET901 (ET901 es una IgG1 completamente humana) como control. Los resultados se muestran en la Figura 9.

**[0090]** Una comparación de ESK1 y el anticuerpo biespecífico ESK1 de unión al complejo peptídico MHC1/WT1 fue determinada por análisis de ForteBio Octe. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10

Proteína	k <sub>d</sub> [1/s]	Error en k <sub>d</sub>	k <sub>a</sub> [1/Ms]	K <sub>D</sub> [nM]
ESK1 ScFv	<b>1,16E-3</b>	1,54E-5	<b>3,68E3</b>	315
ESK1 BiTE	<b>7,04E-3</b>	1,71E-4	<b>1,98E4</b>	355

**[0091] Anticuerpo biespecífico de ESK1 de longitud completa:** en una realización, el anticuerpo biespecífico de ESK-1 es un anticuerpo de longitud completa. Brevemente, se combinaron ESK1 o ET901 (control negativo) y anti-CD3 (OKT3) en proporciones equimolares, produciendo una concentración final de 0,8  $\mu$ g/ml de cada anticuerpo dentro de 0,5 ml. Se añadieron 12,5  $\mu$ l de 2-mercaptoetilamina 1M (2-MEA) a la mezcla de reacción y la solución se incubó a 37°C durante 90 minutos. La 2-MEA se eliminó mediante columnas de desalinización Zeba (100-200  $\mu$ l, 7 kDA, Pierce). La solución se almacenó a 4°C durante la noche para permitir la re-oxidación de los enlaces disulfuro. Los valores de producción se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Proteína	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Cantidad (mg)	Rendimiento teórico (mg)	Tasa de recuperación
ESK1	1,33	0,5	0,67	0,8	84%
901	1,29	0,5	0,64	0,8	80%

[0092] La afinidad de unión se determinó usando ForteBio Octet QK. Se cargaron 5 µg/ml de MHC-WT1 biotinilado en el biosensor de estreptavidina. Después de eliminar el exceso de antígeno, las soluciones de ESK-1-OKT3, ESK1 y OKT3 se analizaron a 20 µg/ml, 10 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, por sus constantes de asociación y disociación. Los parámetros de unión se calcularon utilizando el modelo de sitio de unión 1:1 y se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Proteína	k <sub>d</sub> [1/s]	Error en k <sub>d</sub>	K <sub>a</sub> [1/Ms]	K <sub>D</sub> [nM]
ESK1-OKT3 (biespecífico)	3,30E-3	4,17E-5	3,58E4	92,2
ESK1	4,99E-3	6,78E-5	5,47E5	9,12
OKT3	-	-	-	-

[0093] **Activación de células T mediadas por anticuerpos biespecíficos de ESK.** Se aislaron células T CD3 de PBMC mediante separación de células inmunomagnéticas negativas usando un kit de aislamiento de células pan-T (Miltenyi Biotec Inc., San Diego, CA). El anticuerpo biespecífico de ESK o su anticuerpo biespecífico de control a diversas concentraciones se incubaron con células diana y células T CD3 purificadas a una relación efector/diana (E:T) diferente durante la noche o diferentes períodos de tiempo. Los líquidos sobrenadantes se recolectaron y la liberación de citoquinas se midió mediante ELISA para IFN-γ y TNF-α. Además, la activación de células T mediada por anticuerpos biespecíficos ESK en presencia de células tumorales autólogas de un paciente con cáncer de ovario se evaluó mediante proliferación celular, medida por la incorporación de 3H-timidina durante la noche después de siete días de co-incubación.

[0094] **Expansión de células T específicas de EBV y transducción de genes informadores.** Las células T se enriquecieron a partir de PBMC por agotamiento de los monocitos por adhesión. Las células no adherentes se estimularon con células B transformadas con EBV autólogas irradiadas (EBV-BLCLs) generadas por transformación con la cepa B95,8 de EBV a una relación 20:1 de respuesta: estimulador (RS) y se cultivaron en medio de Yssel, que contiene 5% de HS (YH5; Géminis). A partir del día 7, se añadió interleucina-2 (IL-2) de 10 a 30 unidades/ml a los cultivos de células T cada 2-3 días (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), y se volvieron a estimular semanalmente con los mismos EBV-BLCLs en una relación 4:1 R:S.

[0095] Linfocitos T específicos a EBV se transdujeron con tdrsrRLuc de vector retroviral, se expandieron y enriquecieron por clasificación para PE, tal como se describe anteriormente (Dobrovina, E. et al. Blood 119 (11), 2644-2655 (2012)). Los linfocitos T específicos de EBV transducidos se cultivaron en un matraz G-rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation). Para el estudio de rastreo de células T *in vivo*, se inyectaron diez millones de células en ratones y 4 horas más tarde, se administró i.v. sustrato de luciferasa de Renilla de ViviRen™.

[0096] **Citotoxicidad de células T redireccionadas por anticuerpos específicos contra ESK.** El anticuerpo biespecífico ESK o su anticuerpo biespecífico de control a diversas concentraciones se incubaron con células diana y PBMC, células T CD3 purificadas o células T específicas de EBV a diferentes relaciones efector:diana (E:T) durante 5 horas o durante la noche. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr (después de 5 horas de incubación) o el ensayo de liberación de LDH (después de la incubación durante la noche) utilizando el kit Cytotox 96 no radiorreactivo de Promega siguiendo sus instrucciones. En un caso de un paciente con AML, se combinaron PBMC y blastos autólogos se incubaron en presencia o ausencia de ESK o control biespecífico del anticuerpo a 20 µg/ml y las células se recolectaron y se tiñeron por duplicado con CD33 para blastos de leucemia y CD3 para células T el día 3 y 4. Para el caso de pacientes con cáncer de ovario, las PBMC se incubaron con células autólogas de cáncer de ovario durante una semana y la citotoxicidad se midió mediante un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr.

[0097] **Estudios farmacocinéticos y de biodistribución.** El anticuerpo biespecífico de ESK o el anticuerpo biespecífico de control se marcaron con <sup>125</sup>I (PerkinElmer) utilizando el método de cloramina-T. Se hicieron reaccionar cien (100) µg de anticuerpo con 1 mCi <sup>125</sup>I y 20 µg de cloramina T, se detuvieron con 200 µg de metabisulfato de Na, luego se separaron de <sup>125</sup>I libres usando una columna 10DG equilibrada con 2% de albúmina de suero bovino en PBS. La actividad específica del producto fue de 6 mCi/mg. El anticuerpo biespecífico radiomarcado (2 µg) se diluyó con un anticuerpo biespecífico no etiquetado a 20 µg por dosis y se inyectó en ratones retroorbitalmente. La sangre se recogió en varios puntos de tiempo, se pesó y se midió en un contador gamma. A las 24 horas, los órganos se recolectaron, se pesaron y se midió la actividad en un contador gamma.

**[0098] Ensayos terapéuticos del anticuerpo biespecífico contra ESK en modelos NSG de xenoinjerto de tumor humano.**

Se utilizaron células T específicas de EBV humano para todos los modelos de xenoinjerto, ya que su especificidad antigénica había sido fuertemente sesgada hacia los Ag de EBV, en donde no deberían inducir GVHD. Para el modelo BV173 ALL, dos millones de células de leucemia humana BV173 se inyectaron i.v. en ratones NSG. En el día 5, se confirmó el injerto tumoral mediante la obtención de imágenes de luciferasa de luciérnaga en todos los ratones que se iban a tratar; Los ratones se dividieron al azar en diferentes grupos de tratamiento. En el día 6, se inyectaron por vía intravenosa diez millones de células T específicas de EBV en ratones. Cuatro a 6 horas más tarde, se inyectaron por vía intravenosa 20 µg de anticuerpo biespecífico ESK o su anticuerpo biespecífico de control y se repitió dos veces a la semana por un total de 6 veces durante las 3 semanas de tratamiento, junto con la inyección i.v. de células T una vez en una semana 2 veces. Para el modelo SET-2 AML, se inyectaron por vía intravenosa un millón de células en ratones, el injerto tumoral se confirmó el día 3 mediante imágenes de bioluminiscencia y los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento. En el día 4, se inyectaron i.v. millones de células T específicas para EBV y 6 horas más tarde, se inyectaron 20 µg de anticuerpo biespecífico de ESK o su anticuerpo biespecífico de control i.v. Durante el curso del tratamiento, se administraron células T dos veces por semana y se administraron anticuerpos biespecíficos todos los días durante un total de 6 días. En el modelo primario de ALL, cinco millones de células ALL fueron inyectadas i.v. en ratones NSG. El día 6, se confirmó el injerto tumoral mediante la obtención de imágenes de luciferasa de luciérnaga en todos los ratones que se iban a tratar; Los ratones se dividieron al azar en diferentes grupos de tratamiento. Se inyectaron i.v. 30 millones de células T específicas de EBV en ratones, seguido de una inyección i.v. de 20 µg de anticuerpo biespecífico ESK o su anticuerpo biespecífico de control. La inyección de anticuerpos biespecíficos se administró diariamente y las células T se administraron dos veces por semana durante un total de dos semanas. Para el modelo de mesotelioma JMN, se mezclaron trescientas mil células tumorales con seiscientos mil células T específicas de EBV y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) y una hora más tarde, se administraron 20 µg de anticuerpo biespecífico ESK o control biespecífico inyectado en ratones. Los anticuerpos biespecíficos se administraron todos los días durante un total de 5 días. El crecimiento del tumor se controló mediante imágenes de luciferasa de luciérnaga al menos dos veces por semana, para todos los modelos animales.

**[0099] El anticuerpo ESK biespecífico indujo la respuesta secundaria de células T.**

PBMC, PBMC agotadas de células NK y macrófagos o células T CD3 purificadas de un paciente con cáncer de ovario se cultivaron con células de cáncer de ovario autólogas irradiadas (3000 rad) en una relación E:T de 4-5:1, en presencia o ausencia del anticuerpo biespecífico de ESK, o del anticuerpo biespecífico de control a 0,1 µg/ml, y la presencia de IL-5 humana (5 ng/ml) e IL-2 humana (10 µg/ml) en medio RPMI1640 suplementado con 10% de plasma autólogo (AP) durante 6 días. El día 7, las células se recogieron y se lavaron y se usaron como efectores para el ensayo ELISPOT de IFN-g. En resumen, las placas HA-Multiscreen (Millipore) se recubrieron con 100 µl de anticuerpo anti-IFN-g humano (10 Ag/ml; clon 1-D1K; Mabtech) en PBS, se incubaron durante la noche a 4°C, se lavaron con PBS para eliminar el anticuerpo no unido, y se bloqueó con RPMI 1640/plasma autólogo (AP) al 10% durante 2 horas a 37°C. Las células efectoras se plaquearon con células T<sub>2</sub> (relación 4:1 E: APC) o células tumorales autólogas irradiadas u otras líneas celulares tumorales. Se añadieron varios péptidos de prueba a los pocillos a 20 µg/ml. Pocillos de control negativo contenían APCs y células T sin péptidos o con péptidos irrelevantes. Los pocillos de control positivo contenían células T más APC más 20 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma). Todas las condiciones se realizaron por triplicado. Las placas de microtitulación se incubaron durante 20 horas a 37°C y luego se lavaron exhaustivamente con PBS/Tween al 0,05% y 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección biotinilado contra IFN-g humano (2 µg/ml; clon 7-B6-1; Mabtech) fue añadido. Las placas se incubaron durante 2 horas más a 37°C y el desarrollo de la mancha se realizó según lo descrito (May et al. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007; 13(15 Pt 1):4547-55.). Los números de punto se determinaron automáticamente con el uso de un analizador de imágenes de video asistido por computadora con el software KS ELISPOT 4,0 (Carl Zeiss Vision).

**[0100]** Las células T restantes se expandieron mediante la adición de medio fresco con IL-15 e IL-2 una vez a la semana, hasta 7-8 semanas. En algunos casos, las células T restantes se volvieron a estimular con un tumor autólogo a una relación efector: objetivo de 9:1 durante una semana en las mismas condiciones que para la primera estimulación y la respuesta de las células T se midió mediante IFN-g ELISPOT como se describe.

## Resultados

**[0101] Unión selectiva a células tumorales WT1+ HLA-A0201+ y células T.** El mAb de ESK1 de longitud completa se une a un panel de líneas celulares de leucemia y líneas celulares de mesotelioma de forma restringida a WT1 y HLA-A0201 (Dao et al., *Supra*). La especificidad de unión del anticuerpo biespecífico ESK, una construcción scFv, fue probada. El ensayo de unión ForteBio Octet® (Menlo Park, CA) mostró una K<sub>d</sub> de 355 nM del anticuerpo biespecífico de ESK. El anticuerpo biespecífico de ESK se unió a SET-2, una línea celular de AML doble positiva WT1 y HLA-A0201, de manera dependiente de dosis, incluso a una concentración de 0,1 µg/ml, pero no se unió a HL-60. un WT1 positivo, pero HLA-A0201 negativo, línea celular AML (FIG. 1A, 1B). No se observó una unión positiva del anticuerpo biespecífico de control a las células SET-2 o HL-60 en todas las concentraciones analizadas, lo que indica la especificidad del anticuerpo biespecífico de ESK. Ambos anticuerpos biespecíficos fueron capaces de unirse a las células CD3T humanas purificadas, sin embargo (Fig 1C). Estos resultados demostraron bi-especificidad en que el anticuerpo biespecífico ESK fue capaz de reconocer selectivamente las células tumorales que expresan WT1 y HLA-A0201 y también las células T CD3 humanas.

**[0102] Activación de células T y citotoxicidad contra células tumorales positivas a WT1 y HLA-A0201.** Se ha demostrado que la activación de las células T por construcciones de anticuerpos biespecíficos depende del contacto proximal entre las células T y las células diana que expresan los antígenos diana. Esto es crucial para evitar la respuesta inflamatoria no deseada causada por la activación de las células T, ya que un brazo de la construcción de anticuerpo biespecífico reconoce el complejo invariante de señalización de CD3. En presencia de las células ESK-biespecíficos de anticuerpos y de destino SET-2, un IFN-dependiente de la dosis y se observó liberación a las concentraciones indicadas de anticuerpo biespecífico ESK (FIG. 1D). Las células T CD3 solas o incubadas con control biespecífico de anticuerpos en presencia de células SET-2 mostraron un nivel indetectable de IFN- $\gamma$  y sus valores se restaron de los valores del grupo de anticuerpos biespecíficos de ESK.

**[0103]** Se evaluó la potencia de la citotoxicidad de células T dirigida a anticuerpos biespecíficos de ESK contra células diana que co-expresan WT1 y HLA-A0201. Las células T en reposo purificadas se incubaron conjuntamente con células diana con anticuerpo biespecífico ESK o de control diluido en serie durante 5 horas y se midió la lisis celular mediante liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . El anticuerpo biespecífico de ESK indujo de forma dependiente la citotoxicidad de las células T contra la línea celular SET-2 de AML, pero no HL-60, que fue consistente con su especificidad de unión mostrada en la FIG. 1 (FIG. 2A, 2B). Cuando el tiempo de co-incubación se extendió a 16 h, la lisis de las células diana se incrementó hasta el 90% y el 80% a 3  $\mu\text{g/ml}$  y 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos biespecíficos ESK, respectivamente. Del mismo modo, BV173 y los blastos de CML primaria (WT1+/HLA-A0201+) también fueron lisados por PBMC en presencia de anticuerpo biespecífico ESK de una manera dependiente de dosis en una incubación de 6 horas (FIG. 2C, 2D), y la matanza de BV173 fue evidente a 0,01  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo biespecífico ESK. La muerte relativamente débil contra los blastos de CML podría deberse a un nivel más bajo de expresión de HLA-A2 y unión a ESK en esta muestra. El anticuerpo biespecífico de control no indujo ninguna citotoxicidad significativa, lo que indica que se requiere la especificidad diana para la activación de las células T.

**[0104]** Se abordó la capacidad del anticuerpo biespecífico de ESK para redirigir la citotoxicidad de las células T que previamente se habían cebado repetidamente con un Ag diferente, como el EBV. El uso de tales células T podría potencialmente evitar la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en modelos animales de xenoinjerto, ya que la especificidad antigénica de las células T debería estar fuertemente sesgada hacia solo Ag de EBV. Se ensayó la potencia de la destrucción de células T mediante la titulación de las relaciones efectoras: dianas (E:T) con anticuerpos biespecíficos de ESK a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  por liberación de 5 h-51 Cr. Se observó una potente destrucción dependiente de la dosis para el anticuerpo ESK biespecífico contra todas las células diana analizadas (FIG. 2E, 2F, 2G). Hubo casi 50% de muertes con relaciones E:T más altas y aproximadamente 25% de muertes con una relación E:T tan baja como 1,6:1 para BV173 (FIG. 2E). La destrucción específica se observó para las células diana JMN, en una relación E:T de 3,13 (FIG. 2F). De manera similar, se encontró una fuerte citotoxicidad contra las células primarias del cáncer de ovario que oscilaba entre más del 50% y el 20% de muertes en las diversas relaciones E:T (FIG. 2G). No hubo muerte en los cultivos con células T solas, o con el anticuerpo biespecífico de control contra WT1+/HLA-A0201+ en la línea celular de mesotelioma JMN, ALL BV173, y las células primarias de cáncer de ovario (todas coexpresan WT1 y HLA-A0201). Estos resultados demostraron que el anticuerpo biespecífico ESK puede redirigir específicamente la citotoxicidad potente de las células T previamente activadas con una especificidad diferente a la WT1, para lisar las células tumorales que son WT1 y HLA-A0201 positivas.

**[0105]** A continuación, se investigó más de cerca la activación mediada por anticuerpos biespecíficos de ESK y la citotoxicidad de las células T en un entorno autólogo, imitando la situación humana *in vivo*. Las PBMC de un paciente con cáncer de ovario se estimularon con células tumorales autólogas irradiadas en varias relaciones E:T según se indica, en presencia de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo biespecífico ESK durante 7 días. La citotoxicidad se midió mediante la adición de células autólogas marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  en un cultivo de 6 horas el día 8. Se observó un sacrificio dependiente de la dosis en los cultivos con anticuerpo biespecífico de ESK, incluso a 100 PBMC al comienzo de la estimulación (FIG. 3A). No se observó ninguna matanza en todos los grupos de control. En paralelo, la proliferación de células T se midió por incorporación de 3H-timidina al final del cultivo de ocho días (FIG. 3B). Se observó una proliferación celular significativa solo en los cultivos con anticuerpo ESK biespecífico. Ninguna de las PBMC, ni las células tumorales solas respondieron al anticuerpo específico de ESK o bi-control. Además, los cocultivos de PBMC con células tumorales autólogas solas, o con el anticuerpo biespecífico de control no mostraron proliferación de células T, lo que sugiere que las células T son tolerantes a los Ags autotumorales. Juntos, estos datos demostraron que la activación específica de las células T por el anticuerpo ESK biespecífico requería la presencia de células tumorales y que los anticuerpos biespecíficos de ESK podrían obligar a las células T a superar la tolerancia propia. La capacidad del anticuerpo biespecífico de ESK para inducir la proliferación de células T autólogas y la destrucción de sus células cancerosas diana se ilustró en un segundo modelo autólogo de un paciente con AML (FIG. 16A-16D).

**[0106] Terapia de la leucemia humana que expresa WT1/HLA-A0201 en ratones NSG.** Se ensayó la eficacia terapéutica *in vivo* de anticuerpos biespecíficos de ESK en ratones NSG xenoinjertados intravenosamente 6 días antes con células BV173 Ph+ALL. En el momento del tratamiento, los ratones habían diseminado leucemia visible en el hígado, el bazo y la médula ósea. Las células T fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones y seguidas de anticuerpos biespecíficos 4 horas más tarde. Se observó una inhibición dramática del tumor, que fue especialmente prominente en la médula ósea de ratones que recibieron anticuerpos biespecíficos de ESK, a partir de los tres días posteriores al tratamiento y persistencia hasta 3 semanas (FIG. 4A). Por el contrario, todos los ratones en los grupos

de control que incluyeron a los ratones recibieron células tumorales, tumor junto con células T, tumor con anticuerpo biespecífico de ESK o células tumorales junto con células T y anticuerpo biespecífico de control mostraron un tumor creciente. El crecimiento y la carga masiva de tumores en la médula ósea y otros órganos (FIG. 4A). El promedio de intensidad de fotones de cinco ratones mostró una reducción del tumor de aproximadamente 10 veces en el grupo tratado con anticuerpos biespecíficos de ESK (FIG. 4B). Ninguna GVHD significativa se observó hasta 49 días después de la inoculación de tumor (FIG. 4C). Los resultados demostraron que el anticuerpos biespecífico de ESK podría participar de manera eficiente y dirigir una potente citotoxicidad de las células T para destruir las células diana BV173.

**[0107]** Se ensayó la eficacia terapéutica *in vivo* del anticuerpo biespecífico de ESK en ratones NSG xenoinjertados por vía intravenosa con células de ALL primarias. Las células T se inyectaron por vía intravenosa en ratones, seguido de una inyección de anticuerpo biespecífico ESK. Todos los ratones en los grupos de control mostraron un crecimiento creciente del tumor y una carga masiva de tumores en la médula ósea y otros órganos. Se observó una inhibición tumoral selectiva de anticuerpos biespecíficos dramáticos, que fue especialmente prominente en la médula ósea de los ratones, que persistió más de 3 semanas, 9 días después de la interrupción del tratamiento (FIG. 4D). El promedio de intensidad de fotones de cinco ratones mostró una reducción del tumor de aproximadamente 10-20 veces en el grupo tratado con anticuerpos biespecíficos contra ESK que otros grupos de control (FIG. 4E). No se observó GVHD significativa clínicamente hasta 49 días después de la inoculación del tumor.

**[0108]** Estos resultados demostraron que el anticuerpo biespecífico de ESK podría participar eficazmente y redirigir la potente citotoxicidad de las células T para matar las células de la leucemia primaria. Como se esperaba, las células T humanas específicas de EBV no mostraron una destrucción inespecífica y, por lo tanto, podrían usarse para abordar la actividad de anticuerpos biespecíficos en modelos de xenoinjerto. Este modelo sugirió, y se confirmó con un estudio farmacocinético que la administración dos veces a la semana de anticuerpos biespecíficos ESK no era suficiente, ya que su vida media era de solo unas pocas horas.

**[0109]** Dado que el anticuerpo biespecífico de ESK parece ser más efectivo en el tratamiento de la leucemia de médula ósea como se muestra en el modelo BV173, se investigó este efecto en un modelo SET-2 de células AML más agresivas. Las células SET-2 tienden a migrar a la médula ósea rápidamente después del injerto. La dosis y el programa se guiaron por estudios farmacocinéticos que mostraron una vida media beta plasmática corta de 5 horas del anticuerpo biespecífico ESK (FIG. 17A). La dosis de tratamiento se aumentó a la inyección diaria de anticuerpos biespecíficos durante un total de 6 días consecutivos. Las células se administraron dos veces por semana. Los ratones recibieron tratamiento a partir del día 4 después de la inoculación del tumor, cuando se confirmó el injerto de leucemia por BLI (FIG. 5A, primera fila). Las células SET-2 crecen rápidamente en la médula ósea, y se observó una infiltración masiva de leucemia en la médula ósea de ratones que recibieron células SET-2 o SET-2 junto con las células T. Sin embargo, no se observó leucemia detectable en el grupo tratado con anticuerpos específicos contra ESK hasta 14 días y solo se observó una carga de leucemia mínima hasta 18 días después del día 32, más de una semana después de que se suspendiera el tratamiento. La ganancia en la escala BLI se redujo uniformemente en todos los grupos para las imágenes del día 7 al 18, con el fin de mostrar niveles bajos de leucemia en el punto de tiempo pretratado. El grupo de anticuerpos de control biespecífico mostró una carga de leucemia ligeramente retrasada al principio. Esto podría deberse a la activación de células T específicas de EBV por el brazo anti-CD3 del anticuerpo biespecífico de control, que tenía una afinidad de unión más fuerte para las células T que el anticuerpo biespecífico de ESK (FIG. 1C). Las células T específicas para EBV ya se habían activado y expandido varias veces *in vitro*, haciéndolas más susceptibles a una fuerte estimulación policlonal. Las células T activadas liberan citoquinas inflamatorias que podrían crear un ambiente hostil para las células tumorales. Si bien todos los ratones en el grupo tratado con anticuerpos biespecíficos contra ESK todavía estaban vivos después de un mes, solo hubo un 20% de supervivencia en los grupos de ratones tratados con células T solo o sin tratamiento (FIG. 5B). Los ratones en el grupo tratado con anticuerpos biespecíficos contra ESK no mostraron signos de parálisis del sistema nervioso central (SNC), causado por la infiltración de leucemia en la médula ósea vertebral hasta por 40 días, mientras que casi todos los animales en el grupo control se vieron afectados (FIG. 5C). Estos datos demostraron que el anticuerpo biespecífico ESK es un potente agente terapéutico contra las células de leucemia agresivas en la médula ósea.

**[0110]** El anticuerpo biespecífico de ESK media la retención de células T en los sitios tumorales. Si bien se sabe que los anticuerpos biespecíficos enganchan eficazmente a las células T para destruir objetivos *in vitro*, no se han informado estudios *in vivo* que documenten el mecanismo *in vivo*. Se investigó si la eficacia terapéutica del anticuerpos biespecíficos de ESK fue el resultado de su capacidad para atraer la retención de células T y la persistencia en los sitios de leucemia en animales vivos. Diez millones de células T específicas de EBV transducidas con Renilla/luciferasa se inyectaron en ratones NSG tres días después de que las células de SET-2 AML positivas a GEF/luciferasa se injertaron, y 4 horas más tarde seguidas de una inyección de anticuerpos biespecíficos. La migración de células T se controló mediante imágenes de luminiscencia en el momento de la inyección de células T (0 h), 8 (es decir, 4 h después de la inyección de anticuerpos biespecíficos), 24, 48 y 72 h. Las células T migraron a los pulmones inmediatamente después de la inyección, luego se distribuyeron a otras partes, incluyendo el hígado, el bazo y la médula ósea a las 8 horas (FIG. 6A). La señal de las células T disminuyó gradualmente durante 72 horas. La inyección de células T seguida de un anticuerpo biespecífico de control mostró un patrón de distribución y un curso de tiempo similares a los de las células T solas. Sin embargo, los ratones tratados con anticuerpos biespecíficos de ESK mostraron un aumento significativo en las señales de las células T en los pulmones y BM de 4 a 20 horas, que duró hasta 72 horas. Las células disminuyeron sustancialmente en los pulmones, pero permanecieron en el hígado, el bazo

y la evacuación intestinal. La cuantificación de la intensidad de la bioluminiscencia mostró que 4 horas después de la inyección de anticuerpo biespecífico ESK, había aproximadamente tres veces más acumulación de células T en el hígado, el bazo y la médula ósea en comparación con los otros dos grupos de control (FIG. 6B). El seguimiento de la progresión de la leucemia al mismo tiempo reveló una correlación inversa entre la retención de células T y la carga de leucemia (FIG. 6C). Estos resultados proporcionaron una fuerte evidencia *in vivo de* que anticuerpos biespecíficos de ESK podría mediar la retención prolongada de las células T en los sitios de leucemia, y dirigió la citotoxicidad de las células T a las células tumorales que expresaban WT1 y HLA-A0201.

**[0111] Terapia de mesotelioma en ratones NSG.** Habiendo demostrado la potente actividad terapéutica del anticuerpo biespecífico de ESK en dos modelos de xenoinjerto de leucemia, se investigó la eficacia del anticuerpo biespecífico de ESK en el tratamiento de tumores sólidos agresivos utilizando un modelo i.p. para simular el mesotelioma de la cavidad peritoneal. Las células de mesotelioma JTN WT1+/HLA-A0201+ se mezclaron con células T específicas de EBV en una proporción diana-efector de 1:2 y se inyectaron de forma i.p. en ratones NSG. Los anticuerpos biespecíficos se inyectaron i.v. una hora más tarde y se repitieron durante 5 días consecutivos. Las imágenes de bioluminiscencia un día después no mostraron ningún tumor visible en los ratones tratados con el anticuerpo ESK biespecífico, mientras que los ratones en tres grupos de control mostraron una carga tumoral visible, lo que sugiere que el anticuerpo biespecífico ESK había eliminado las células tumorales (FIG. 7A). La supresión del tumor por el anticuerpo biespecífico ESK persistió hasta el día 23; 18 días después de la interrupción del tratamiento, solo se observó una carga tumoral mínima en los ratones. El promedio de la intensidad de bioluminiscencia de cinco ratones por grupo mostró una supresión tumoral persistente y aproximadamente más de 20 veces en el día 23 (FIG. 7B).

**[0112] Farmacocinética:** para determinar la farmacocinética del anticuerpo biespecífico de ESK, se inyectó la construcción marcada con <sup>125</sup>I traza por vía intravenosa en C57 BL6/J, o por vía intraperitoneal en ratones BALB/c, y se midió la radioactividad de la sangre durante 48-52 horas. El anticuerpo biespecífico inyectado por vía intravenosa se redistribuyó rápidamente de la sangre al tejido con una vida media alfa de 30 minutos, seguido de la depuración con una vida media beta de 5 horas. Después del suministro intraperitoneal, los niveles de anticuerpos biespecíficos aumentaron en la sangre, alcanzando un máximo de 3 horas después de la inyección. La construcción luego se aclaró con la misma vida media beta. La exposición total (área bajo la curva) de la inyección intravenosa fue mayor que con la inyección intraperitoneal. El patrón de biodistribución de los anticuerpos se determinó utilizando las mismas construcciones radiomarcadas. Después de 24 horas, se detectó <1% de dosis inyectada/gramo en todos los tejidos (FIG. 17A, 17B).

**[0113]** El anticuerpo biespecífico de ESK indujo una respuesta secundaria de células Ts a un epítipo HER2 en el contexto de HLA-A0201. El mecanismo de acción de los anticuerpos biespecíficos se ha atribuido a su efecto directo de unir las dianas de las células cancerosas y las células T para formar una sinapsis citolítica. Se investigó si dicho contacto proximal podría activar directamente las células T preexistentes en la población específica para otros antígenos tumorales expresados por las células tumorales autólogas para determinar si un anticuerpo biespecífico podría ejercer un efecto vacunal utilizando el modelo *in vitro* autólogo de un paciente positivo HLA-A\*02:01 con cáncer de ovario. Las PBMC del paciente se cultivaron conjuntamente con sus células tumorales autólogas en presencia de un anticuerpo biespecífico ESK de dosis baja; una semana más tarde, las respuestas de células T restringidas a HLA-A\*02:01 específicas de epítipo se evaluaron mediante el ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$ . Los grupos de control que incluyen las células solas o con el anticuerpo biespecífico de control no mostraron ninguna liberación específica de IFN- $\gamma$ . Las células tumorales del paciente expresaron tanto WT1 RMF como HER2-neu en su superficie celular (FIG. 18A-C). Sorprendentemente, se indujo una fuerte respuesta secundaria de células T contra el epítipo HER2-neu-369, las células tumorales autólogas solas y las células SET-2 AML, mucho después de que terminaran las interacciones mediadas por ESK-bi (FIG. 19A-F). No se pudo medir ninguna respuesta en estas células autólogas contra 56 epítopos derivados de WT1 combinados, epítopos de WT1 RMF, AILDFO5 o LDF; epítipo derivado de p53 264-273; Prame-300, Prame-435; El epítipo EWings del sarcoma EW, MuC1-15, -16, y -18; o células HL60. Dado que SET-2 no expresa HER2-neu, y las células T no reconocieron WT1 RMF, la respuesta de las células T contra SET-2 mostró el reconocimiento de otros epítopos aún por definir que no son ni WT1 ni HER2-neu. Estos resultados demostraron claramente que el anticuerpo biespecífico de ESK podría inducir respuestas de células T secundarias a múltiples antígenos tumorales, proporcionando así un efecto vacunal inesperado.

**[0114]** En principio, una respuesta secundaria de células T debería requerir APC profesionales entre las PBMC que podrían captar y presentar los antígenos intracelulares liberados después de la muerte de las células tumorales. Alternativamente, las células tumorales podrían activar directamente células T específicas de epítopos preexistentes durante el contacto próximo entre las células T y el tumor. Para aclarar el mecanismo, se investigó si el efecto de la vacuna podría ocurrir con células T purificadas y PBMC cargadas de células NK y células macrófagas (células T más B) frente a PBMC completas como células efectoras. Curiosamente, las células T solas como efectores todavía eran capaces de responder a HER2-neu, células tumorales autólogas y células SET-2, en una magnitud similar a la producida por las células T más B (FIG. 19C) o PBMC completas (FIG. 19D). Para excluir la posibilidad de la presentación en células T de estos antígenos autocáncer, las células T purificadas se cultivaron conjuntamente con lisados de células tumorales autólogas, generadas por congelación y descongelación repetitiva, en presencia o ausencia de anticuerpo biespecífico ESK. No se observó respuesta de células T contra el epítipo HER2-neu o las células tumorales en este contexto (Figura 19D). Estos resultados demostraron que ni las APC profesionales ni los

tumores epitópicos se requerían para la respuesta secundaria de células Ts inducidas por anticuerpos biespecíficos a HER2-neu u otros epítomos presentes en células tumorales, por lo tanto, la presentación cruzada no fue el mecanismo.

5 [0115] También se examinó si la presentación de antígenos de células tumorales dependía de moléculas co-estimuladoras. Mientras que los monocitos CD14+ de un donante sano mostraron una fuerte expresión de CD86, las células de cáncer de ovario tenían poca expresión de CD86. Los resultados indicaron que era improbable que una molécula clave coestimuladora CD86 estuviera involucrada en la presentación del antígeno de células tumorales (FIG. 20). No se detectó expresión de CD86 o ICOSL. La falta de moléculas coestimuladoras es una de las razones por las que las células tumorales son células presentadoras de antígenos deficientes; sin embargo, ciertas citoquinas pueden proporcionar señales coestimulantes para cumplir con los requisitos para la activación de células T específicas de tumores. El anticuerpo biespecífico de ESK indujo la secreción de IFN-gamma y TNF-alfa tanto por las PBMC como por las células T (FIG. 19E-F).

15 [0116] Para ensayar si el anticuerpo biespecífico ESK tenía algún efecto a largo plazo sobre la población de células T, las células T se expandieron *in vitro* en dosis bajas de IL-15 e IL-2, después de la primera activación por anticuerpo biespecífico de ESK. Mientras que las células T en los grupos de control no sobrevivieron más de una semana en el cultivo, las células T activadas por anticuerpo biespecífico de ESK continuaron creciendo durante 2 meses, sin activación adicional. El análisis de fenotipo reveló que siete semanas después de la activación por anticuerpo biespecífico de ESK y tumor, las células T CD8+ aumentaron a 89% de la población y las células T CD4+ disminuyeron a 6% (FIG. 21A-B). Curiosamente, entre las células CD8+/CCR7-, las células CD45RA-/CD45RO+ aumentaron, lo que indica un fenotipo de memoria efectora. Es importante que, incluso en este punto de tiempo tardío, estas células T aún conservan su especificidad original a las células tumorales autólogas y las células de SET-2 AML (Figura 21C). Estos resultados indicaron que el anticuerpo biespecífico de ESK podría inducir respuestas de células T CD8 secundarias específicas de larga duración.

#### 25 Discusión

30 [0117] La presente descripción se refiere a la primera formación de anticuerpo biespecífico derivado de un mAb de tipo TCR. El anticuerpo biespecífico de ESK fue específico para el epítomo de RMF WT1 presentado por la molécula HLA-A0201. El anticuerpo ESK biespecífico mostró una potente actividad antitumoral contra múltiples cánceres, incluidas las células de LLA, AML, mesotelioma y cáncer de ovario primario, tanto *in vitro* como *in vivo*. El estudio presentado aquí se distingue de los estudios anteriores, ya que: 1) el mAb es un mAb similar a TCR que permite el reconocimiento de una diana intracelular específica del tumor; 2) la densidad diana en las células tumorales es extremadamente baja, lo que proporciona una prueba de concepto que podría abrir la aplicación de anticuerpos biespecíficos a un universo de objetivos mucho más grande; 3) se demostraron los mecanismos de la actividad del anticuerpo biespecífico ESK *in vivo* con doble célula efectora simultánea y el rastreo de células diana (estudios previos de anticuerpos biespecíficos no lo han demostrado porque en la mayoría de los estudios en animales, las células T efectoras y las células diana se mezclaron antes de la inyección; 4) utilizando un sistema autólogo, se demostró que el anticuerpo biespecífico ESK podría romper la tolerancia de las células T para matar las células primarias del cáncer de ovario; 5) el anticuerpo biespecífico de ESK indujo respuestas de células T secundarias específicas de larga vida contra otros antígenos tumorales, como HER2-neu. Además, las respuestas de las células T secundarias no estaban mediadas por la presentación cruzada efectuada por las APC clásicas, sino que se debió a la interacción directa y físicamente cercana entre las células T y las células tumorales, fomentada por el anticuerpo biespecífico.

45 [0118] Todas las construcciones de anticuerpos biespecíficos que se encuentran actualmente en el desarrollo de proteínas de la superficie celular diana, como CD19, CD33, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que son antígenos de linaje o diferenciación que se encuentran en células normales. En contraste, la presente divulgación demuestra por primera vez que una construcción de anticuerpo biespecífico similar a TCR es capaz de reconocer un epítipo de baja densidad de un complejo péptido/MHC de una diana específica de tumor. Esto argumenta en contra de la opinión tradicional de que un constructo de anticuerpo biespecífico de scFv podría no ser adecuado para atacar un Ag de baja densidad porque la afinidad sería demasiado baja o la capacidad de activar la citotoxicidad por las células T sería insuficiente. La presente divulgación demuestra por primera vez que una construcción de anticuerpo biespecífico imitador de TCR es capaz de una potente actividad terapéutica en varios modelos de ratón tanto de tumores sólidos como hematopoyéticos, proporcionando la prueba de concepto para ampliar enormemente el desarrollo de anticuerpos biespecíficos dirigidos a otros antígenos tumorales intracelulares específicos del cáncer. Aunque se sabe a partir de ensayos *in vitro* que los anticuerpos biespecíficos ponen a las células T en contacto con las células cancerosas, tal mecanismo no se había observado previamente *in vivo*. La presente divulgación proporciona la prueba de concepto para el desarrollo futuro de mAbs biespecíficos dirigidos a otros Ags de tumores intracelulares. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de ESK descrito aquí podría ampliar la aplicación terapéutica de la plataforma.

65 [0119] En una realización, el anticuerpo biespecífico de ESK indujo actividad citotóxica rápida y potente *in vitro* contra linfoides y leucemias mieloides, mesotelioma, y células de cáncer de ovario primarias, co-expresión de WT1 y HLA-A0201. La lisis de las células diana mediante células T en reposo o células T específicas de EBV se pudo detectar en una co-incubación de cinco horas, en comparación con los estudios con otras construcciones de anticuerpos biespecíficos que mostraron una muerte de células T después de más de 16 horas de cultivo. La actividad citolítica

del anticuerpo biespecífico de ESK podría mejorarse aún más por un período más largo de incubación, demostrado por hasta el 80-90% de la destrucción lograda con las células de SET-2 AML. Esto compartió una característica similar con otros mAbs biespecíficos de anticuerpos específicos para CD33 y CD19, lo que sugiere que el anticuerpo biespecífico ESK se adhiere a las células T a objetivos de forma serial. La secreción de IFN- $\gamma$  demostró además la activación de células T específicas de diana mediadas por anticuerpos biespecíficos de ESK. Una observación importante con relevancia clínica es que el anticuerpo biespecífico de ESK podría activar de manera eficiente las células T no manipuladas de un paciente con cáncer de ovario para proliferar y matar las células tumorales autólogas, lo que sugiere que la presencia de un anticuerpo biespecífico de ESK podría llevar a que células T superen la tolerancia al auto-tumor Ags. Se sabe que la infiltración de células T se observa con frecuencia en tumores sólidos. El peso molecular relativamente bajo del anticuerpo biespecífico permitiría una mejor penetración en tumores sólidos del anticuerpo biespecífico de ESK para activar células T anérgicas o que no responden para matar las células tumorales circundantes.

**[0120]** La citotoxicidad *in vitro* de anticuerpo biespecífico ESK se evidenció *in vivo* también, como se muestra por su actividad terapéutica notablemente potente contra PH1+ALL, AML y mesotelioma en modelos de xenoinjerto. En ambos modelos de leucemia, la eliminación de las células tumorales fue evidente, especialmente en la médula ósea. Además, el anticuerpo ESK biespecífico previno y retrasó la parálisis del SNC, un rasgo característico de la leucemia causada por la infiltración de la médula ósea vertebral.

**[0121]** La capacidad del anticuerpo biespecífico de ESK para matar las células de leucemia *in vivo* cuando se inyectaron las células T por separado de las células tumorales (un horario no utilizado normalmente en los experimentos de anticuerpos biespecíficos preclínicos), plantearon preguntas sobre el mecanismo de actividad de anticuerpos biespecíficos *in vivo*. El estudio con células SET-2 planteó aún más la cuestión de si el anticuerpo biespecífico ESK recluta y retiene activamente los efectores de células T en el objetivo. Estas preguntas se abordaron al rastrear simultáneamente células T efectoras y células SET-2 AML utilizando imágenes de bioluminiscencia dual. Había aproximadamente un aumento de tres veces en las células T en la médula ósea de los ratones tratados con anticuerpo biespecífico de ESK. La retención de células T estaba bien correlacionada con la reducción del tumor. La presente divulgación proporciona evidencia directa *in vivo* de que el anticuerpo biespecífico de ESK podría comprometer eficazmente las células T con dianas y matar las células tumorales *in situ*.

**[0122]** Se investigó la actividad terapéutica del anticuerpo biespecífico ESK en un modelo de tumor sólido con un mesotelioma peritoneal humano en ratones NSG. El estudio PK mostró que la inyección i.v. del anticuerpo biespecífico ESK dio un nivel más alto en el torrente sanguíneo que la inyección i.p., pero que la vida media plasmática del anticuerpo biespecífico fue característicamente corta. Se observó una inhibición rápida y dramática de los tumores en los ratones tratados, lo que sugiere que el anticuerpo biespecífico de ESK obtuvo un acceso rápido a las células tumorales peritoneales. Los estudios de PK confirmaron las observaciones farmacocinéticas de otras construcciones de anticuerpos biespecíficos, lo que sugiere que la administración continua de anticuerpos biespecíficos contra ESK puede ser necesaria para lograr la mejor eficacia terapéutica.

**[0123]** Similar a otras construcciones de anticuerpos biespecíficos, una limitación del anticuerpo biespecífico ESK es también la falta de una región Fc natural que impida la interacción con el receptor FcRn neonatal, que es necesario para retrasar el aclaramiento de mAb y para sangre más larga PK. Diseñar una forma bi-específica de mAb con especificidades de doble diana y mantener su arquitectura natural podría ofrecer una vida media más larga y podría mejorar significativamente su eficacia en la aplicación clínica. Curiosamente, se observó que el mAb ESK1 de longitud completa era más eficaz para erradicar las células BV173 de la leucemia diseminada en pulmón e hígado en ratones, mientras que el anticuerpo biespecífico de ESK parecía ser más efectivo en la médula ósea. Esto puede reflejar el contenido y los tipos de efectores encontrados en diferentes órganos del cuerpo (p.ej., macrófagos en el hígado y células T en la sangre y la médula ósea). Esta discrepancia también sugiere que las combinaciones de IgG de longitud completa y las formas de anticuerpos biespecíficos usadas juntas podrían proporcionar efectos aditivos, si se pudiera determinar la dosis y el programa apropiados. El TCR terapéutico en el desarrollo de mAb es relativamente reciente y hay muchas preguntas sin respuesta con respecto a sus posibles aplicaciones. El desarrollo de enfoques mAb biespecíficos para los mAb TCRm permitirá ampliar su alcance para incluir no solo antígenos específicos de tumores, sino también objetivos intracelulares y otros objetivos importantes de densidad ultra baja.

**[0124]** Los mecanismos de acción de anticuerpos biespecíficos hasta la fecha se han atribuido a una interacción directa entre las células T y la diana celular especificada por el mAb. Un descubrimiento intrigante fue que el anticuerpo biespecífico de ESK para el epítipo RMF WT1 indujo una respuesta secundaria de células T altamente específica para otros antígenos del cáncer (y no el objetivo WT1), como el epítipo HER2-neu 369, en un modelo autólogo de cáncer de ovario. Se demostró que dicho contacto próximo entre las células T y las células diana podría reactivarse directamente (sin presentación cruzada) o las células T anérgicas que existían en el paciente, para reaccionar con otros antígenos del cáncer. Sorprendentemente, se detectó una respuesta de células T específica del epítipo HER2-neu robusta y de larga duración, así como otras reactividades específicas del cáncer. Hubo un aumento en las células T CD8 con el fenotipo de la memoria efectora, lo que respaldó aún más la observación de nuevas respuestas de células T específicas de epítipo, porque las células T CD8 deben haberse activado para proliferar en respuesta a los epítopos restringidos HLA-A\*02:01. La magnitud y la duración de la activación única del anticuerpo biespecífico ESK fue muy superior a la respuesta de células T específica del epítipo inducida por el péptido tradicional/APC

generalmente observada (Dao et al., *Supra*). De manera interesante, el anticuerpo biespecífico de ESK no indujo respuestas de células T contra el epítipo objetivo original WT1-RMF, a pesar de que el paciente tenía células T reactivas a WT1 en su circulación como consecuencia de una terapia celular adaptativa previa. Estos hallazgos fueron consistentes con la hipótesis de que el anticuerpo biespecífico está acercando los TCR de las células T a la célula tumoral para reconocer nuevos epítipos de MHC/péptido directamente en el tumor y que la unión del anticuerpo biespecífico de ESK a su péptido/epítipo MHC durante esta fase de estimulación de células T está bloqueando cualquier reconocimiento del epítipo RMF/A0201 del TCR cognado de las células T.

**[0125]** La expansión de células T contra diversos antígenos tumorales no presentes en la vacuna original se ha detectado en pacientes que recibieron vacunas o infusiones de células T y se ha asociado con respuestas clínicas; este fenómeno se conoce como "propagación de epítipos", y se cree que está mediado por la presentación cruzada mediante el procesamiento de APC de las células tumorales apoptóticas (Corbiere, V. et al. *Cancer Res.* 71 (4), 1253-1262 (2011)). Se ha informado un efecto de la vacuna de mAb a CD20; el efecto también parece estar mediado por la opsonización mediada por anticuerpos de las células diana en APC (Hilchey et al. *Blood* 113 (16), 3809-3812 (2009)).

**[0126]** El descubrimiento descrito en la presente de un nuevo mecanismo de acción para un mAb biespecífico puede tener particularmente importantes implicaciones para la terapia futura, como la infiltración de células T en los tumores sólidos se correlaciona con respuestas clínicas. Con su bajo peso molecular, los anticuerpos biespecíficos podrían penetrar en los tumores sólidos para activar las células T anérgicas o que no responden para destruir las células tumorales que expresan no solo la diana antigénica conocida del anticuerpo biespecífico, sino también otros antígenos tumorales específicos no definidos. La expansión clonal de células T citotóxicas mediada por anticuerpos biespecíficos para una variedad de nuevos epítipos debería contribuir en gran medida a su eficacia terapéutica a largo plazo al prevenir el escape de variantes de células cancerosas o células de baja densidad de antígenos, así como a promover la inmunidad de larga duración. Además, el efecto de la vacuna podría usarse para la expansión *ex vivo* antes de la terapia de células T adoptiva específica.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0127]**

<110> Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Eureka Therapeutics, Inc. SCHEINBERG, et al.

<120> ANTI-WT1/HLA BI-SPECIFIC ANTIBODY

<130> 27527/48317 PCT

<150> US 61/901,310

<151> 2013-11-07

<150> US 62/037,875

<151> 2014-08-15

<160> 142

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 1

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 742 224 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

5 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
1 5 10

<210> 3

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 3

20 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

25

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 4

35

Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

40

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 5

ggaggcacct tcagcagcta tgctatcagc 30

50

<210> 6

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 6

60 gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

65

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintéticoe

<400> 7  
 5 cggattcccc cgtactacgg tatggacgtc 30

<210> 8  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

15 <400> 8

**Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr**  
 1 5 10

20 <210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 9

30 **Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser**  
 1 5

35 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 10

45 **Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val**  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

55 <400> 11  
 tctggaagca gctccaacat cggaagtaat tatgtatac 39

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

65



ES 2 742 224 T3

<223> Polinucleótido sintético

<400> 15

5 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
 10 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc 120  
 15 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180  
 20 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240  
 25 atggagctga gcagcctgag atctgaggac aogggcgtgt attactgtgc gagacggatt 300  
 30 cccccgtact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcacogt ctctctca 357

<210> 16

20 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<400> 16

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

<210> 17

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

ES 2 742 224 T3

<223> Polinucleótido sintético

<400> 17

5	cagactgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cggggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccaacagctc	120
10	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg	240
	tcogtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgta	300
15	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt	333

<210> 18

20 <211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<400> 18

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

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

ES 2 742 224 T3

<210> 19  
 <211> 750  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 19

10

cagactgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cggggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccaacagctc 120

15

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtcctt 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg 240

20

tccgtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgta 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc 360

ggcggctctg gtggtggatc cctcgagatg gcccaggtgc agctggtgca gtctggggct 420

25

gaggtgaaga agcctgggtc ctcgggtgaag gtctcctgca aggccttctgg aggcaccttc 480

agcagctatg ctatcagctg ggtgcgacag gccctggac aagggttga gtggatggga 540

30

gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg cagagtcacg 600

attaccgagg acgaatccac gagcacagcc tacatggagc tgagcagcct gagatctgag 660

gacacggccg tgtattactg tgcgagacgg attccccctg actacggtat ggacgtctgg 720

35

ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctca 750

<210> 20  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

45

<400> 20

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn  
 1 5 10

50

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

60

<400> 21

Arg Thr Tyr Tyr Gly Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val  
 1 5 10 15

65

Lys Ser

ES 2 742 224 T3

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Polipéptido sintético  
  
<400> 22  
10  
**Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile**  
**1 5**  
  
15 <210> 23  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Polinucleótido sintético  
  
<400> 23  
ggggacagtg tctctagcaa cagtgctgct tggaac 36  
25  
<210> 24  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30  
<220>  
<223> Polinucleótido sintético  
  
<400> 24  
35 aggacatact acgggtccaa gtggataat gattatgcag tatctgtgaa aagt 54  
  
<210> 25  
<211> 27  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Polinucleótido sintético  
45 <400> 25  
ggtcgcttag gggatgcttt tgatac 27  
  
<210> 26  
<211> 11  
50 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Polipéptido sintético  
55  
<400> 26  
  
**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**  
60  
  
<210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 742 224 T3

<220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 27

5

**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**

10 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 28

20

**Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr**  
**1 5**

<210> 29  
<211> 33  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

30

<400> 29  
cgggcaagtc agagcattag cagctatta aat 33

<210> 30  
<211> 21  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Polinucleótido sintético

<400> 30  
gctgcatcca gttgcaaag t 21

45 <210> 31  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

<400> 31  
caacagagtt acagtacccc tctcact 27

55

<210> 32  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60

<220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 32

65

ES 2 742 224 T3

1 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 5 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
 10 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 15 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Gly Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 20 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 25 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 30 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
 35 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 40 115 120

<210> 33  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 33

45 caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60  
 acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgaa ctggatcagg 120  
 cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacgggtc caagtqgtat 180  
 50 aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240  
 cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300  
 55 agaggtcgct taggggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt cacogtctct 360  
 tca 363

<210> 34  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 742 224 T3

<400> 34

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

15 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

20 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu  
85 90 95

35 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

<210> 35

<211> 324

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

40 <400> 35

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

45 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

50 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctctcac tttcggcgga 300

gggaccaaag tggatatcaa acgt 324

55 <210> 36

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 36

65

ES 2 742 224 T3

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

ES 2 742 224 T3

<210> 37  
 <211> 750  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 37

10

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatthtg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga      300
gggaccaaaag tggatatcaa acgttctaga ggtggtggtg gttagcggcgg cggcggctct      360
ggtggtggtg gatccctcga gatggcccag gtacagctgc agcagtcagg tccaggactg      420
gtgaagccct cgcagaccct ctcactcacc tgtgccatct ccggggacag tgtctctagc      480
aacagtgctg cttggaactg gatcaggcag tcccatoga gaggccttga gtggctggga      540
aggacatact acgggtccaa gtggtataat gattatgcag tatctgtgaa aagtcgaata      600
accatcaacc cagacacatc caagaaccag ttctccctgc agctgaactc tgtgactccc      660

gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcaaga ggtcgcttag gggatgcttt tgatatctgg      720
ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca      750
    
```

40

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 38

50

```

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Trp Ile Ser
1           5           10
    
```

55

<210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 39

65

ES 2 742 224 T3

Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15

5 Gly

<210> 40  
 <211> 12  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 15 <400> 40

Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10

20 <210> 41  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 30 <400> 41  
 ggatacagct tcaccaact ctggatcagc 30  
 <210> 42  
 <211> 51  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 40 <400> 42  
 aggggtgatc ctggctactc ttatagcacc tacagcccgt cctccaagg c 51  
 <210> 43  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 43  
 gtacaatata gtggctacta tgactgggtc gacccc 36  
 55 <210> 44  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 44

65

ES 2 742 224 T3

**Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn**  
**1 5 10**

5 <210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 45

15 **Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser**  
**1 5**

20 <210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 46

30 **Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val**  
**1 5 10**

35 <210> 47  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

45 <400> 47  
 tctggaagca gctccaacat cggaagtaat actgtaaac 39

50 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

60 <400> 48  
 agtaataatc agcggccctc a 21

65 <210> 49  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

75 <400> 49  
 gcagcatggg atgacagcct gaatggtgg gtg 33

<210> 50  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 50

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
 20 25 30

20

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

25

Gly Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

30

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

35

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

40

Ala Arg Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly  
 100 105 110

45

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 51  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

55

<400> 51

60

65

ES 2 742 224 T3

5 cagatgcagc tggatgcagtc cggagcagag gtgaaagagc ccggggagtc tctgaggatc 60  
 tctgtgaagg gttctggata cagcttcacc aacttctgga tcagctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggagg gttgatcctg gctactctta tagcacctac 180  
 agccccctct tccaaggcca cgtcaccatc tcagctgaca agtctaccag cactgcctac 240  
 10 ctgcagtgga acagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagagtacaa 300  
 tatagtggct actatgactg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tca 363

15 <210> 52  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25 <400> 52

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

65 <210> 53  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 53

ES 2 742 224 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

caggctgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcaggtc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag      240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttgggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt                                     333
  
```

<210> 54  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 54

```

25      Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
        1           5           10
30      Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
        20           25           30
35      Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35           40           45
40      Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
        50           55           60
  
```

ES 2 742 224 T3

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

<210> 55

<211> 759

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

60

<400> 55

caggctgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

65 tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcaggtc 120

ES 2 742 224 T3

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 5 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttgggtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc 360  
 10 ggcggctctg gtggtggtgg atccctcgag atggcccaga tgcagctggt gcagtcogga 420  
 gcagaggtga aagagcccgg ggagtctctg aggatctcct gtaagggttc tggatacagc 480  
 ttcaccaact tctggatcag ctgggtgctc cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg 540  
 15 gggaggggtg atcctggcta ctcttatagc acctacagcc cgtccttcca aggccacgtc 600  
 accatctcag ctgacaagtc taccagcact gcctacctgc agtggaacag cctgaaggcc 660  
 20 tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga gtacaatata gtggctacta tgactggttc 720  
 gaccctggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctca 759

25 <210> 56  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 56

35 Gly Tyr Asn Phe Ser Asn Lys Trp Ile Gly  
 1 5 10

40 <210> 57  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 57

50 Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Ser Asp Ile Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15

50 Gly

55 <210> 58  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 58

65 His Thr Ala Leu Ala Gly Phe Asp Tyr  
 1 5

ES 2 742 224 T3

<210> 59  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 59  
 10 ggctacaact ttagcaaca gtggatcggc 30  
 <210> 60  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 20 <400> 60  
 atcatctatc cgggttactc ggacatcacc tacagcccgt cctccaagg c 51  
 <210> 61  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 30 <400> 61  
 cacacagctt tggccggctt tgactac 27  
 <210> 62  
 <211> 11  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 62  
 45 **Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Trp Leu Ala**  
**1 5 10**  
 <210> 63  
 <211> 7  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55 <400> 63  
 60 **Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser**  
**1 5**  
 <210> 64  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>

ES 2 742 224 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 64

5

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr  
1 5

<210> 65

10

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Polinucleótido sintético

<400> 65

cgggccagtc agaatatcaa taagtgctg gcc 33

20

<210> 66

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 66

aaggcgtcta gtttagaaag t 21

30

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 67

40

caacaatata atagttatgc gacg 24

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

50

<400> 68

55

60

65

ES 2 742 224 T3

1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 5 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Asn Lys  
 10 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 15 Ala Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Ser Asp Ile Thr Tyr Ser Pro Ser Phe  
 20 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr  
 25 Leu His Trp His Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 30 Val Arg His Thr Ala Leu Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr  
 35 Leu Val Thr Val Ser Ser

35 <210> 69  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 69

45 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggagagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaagg gttctggcta caactttagc aacaagtgga tcggctgggt gcgccaattg 120  
 50 cccgggagag gcctggagtg gatagcaatc atctatcccg gttactogga catcacctac 180  
 agcccgtcct tccaaggccg cgtcaccatc tccgccgaca cgtccattaa caccgcctac 240  
 ctgcactggc acagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attattgtgt gcgacacaca 300  
 55 gctttggccg gctttgacta ctggggcctg ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 354

60 <210> 70  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 65 <400> 70

ES 2 742 224 T3

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

<210> 71  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

40 <400> 71

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca 60  
 45 atcacttgcc gggccagtca gaatatcaat aagtggctgg cctggtatca gcagagacca 120  
 gggaaagccc ctcagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 50 gatgattttg caacttatta ctgccaaaca tataatagtt atgcgacggt cggccaaggg 300  
 accaaggtgg aatcaaacg t 321

55 <210> 72  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 72

65



ES 2 742 224 T3

<210> 73  
 <211> 738  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 73

10

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca 60

atcacttgcc gggccagtca gaatatcaat aagtggctgg cctggtatca gcagagacca 120

15

gggaaagccc ctcagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct 180

aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

20

gatgattttg caacttatta ctgccaaaca tataatagtt atgcgacggt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg ttctagaggt ggtggtgta gcggcggcgg cggctctggt 360

ggtggtggat ccctcgagat ggcccaggtg cagctggtgc agtctggagc agaggtgaaa 420

25

aagcccggag agtctctgaa gatctcctgt aagggttctg gctacaactt tagcaacaag 480

tggatcggct ggggtgcgcca attgcccggg agaggcctgg agtggatagc aatcatctat 540

30

cccggttact cggacatcac ctacagcccg tccttccaag gccgcgtcac catctccgcc 600

gacacgtcca ttaacaccgc ctacctgcac tggcacagcc tgaaggcctc ggacaccgcc 660

atgtattatt gtgtgcgaca cacagctttg gccggctttg actactgggg cctgggcacc 720

35

ctggtcaccg tctcctca 738

<210> 74  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

45

<400> 74

50

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser  
 1 5 10

<210> 75  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

60

<400> 75

65

ES 2 742 224 T3

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Arg  
 1 5 10 15

5 Gly

<210> 76

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 76

Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr  
 1 5 10

20

<210> 77

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

30 <400> 77

gggttcacct ttgatgatta tggcatgagc 30

<210> 78

<211> 51

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

40

<400> 78

ggtattaatt ggaatggtgg tagcacaggt tatgcagact ctgtgagggg c 51

<210> 79

<211> 36

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Polinucleótido sintético

<400> 79

gagcgtggct acgggtacca tgatccccat gactac 36

55 <210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 80

65 Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10



ES 2 742 224 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 86

5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

15

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

20

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

25

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

30

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

35

Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

40

<210> 87

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 87

50

gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt cacctttgat gattatggca tgagctgggt cgcceaagct 120

55

ccaggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180

gcagactctg tgagggggcog attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

60

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagagcgt 300

ggctacgggt accatgatcc ccatgactac tggggccaag gcaccctggt gaccgtctcc 360

tca 363

65

<210> 88

<211> 109

ES 2 742 224 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 88

10 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

15 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20

20 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45

25 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

30 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

35 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

40 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 89  
<211> 327  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 89

50 cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60

55 acctgtggga gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcaact ggtaccagca gaagccaggc 120

60 caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180

65 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 90  
<211> 249

ES 2 742 224 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 90

10 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

15 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30

20 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

25 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

30 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

35 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
 85 90 95

40 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Arg Gly  
 100 105 110

45 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Glu Met Ala  
 115 120 125

50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 130 135 140

55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 145 150 155 160

60 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 165 170 175

65 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 180 185 190

70 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 195 200 205

75 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

80 Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr Trp Gly  
 225 230 235 240

85 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

ES 2 742 224 T3

<210> 91  
 <211> 747  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 91

10

```

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt      60
acctgtggga gaaacaacat tggaagtaa agtgtgcaact ggtaccagca gaagccaggc      120
caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg      240
gatgaggcog actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc      300
ggagggacca agctgaccgt cctaggttct agaggtgggtg gtggtagcgg cggcggcggc      360
tctggtggat ccctcgagat ggccgaagtg cagctggtgc agtctggggg aggtgtggta      420
cggcctgggg ggtccctgag actctcctgt gcagcctctg ggttcacott tgatgattat      480
ggcatgagct ggggtccgca agctccaggg aaggggctgg agtgggtctc tggtattaat      540
tggaatggtg gtagcacagg ttatgcagac tctgtgaggg gccgattcac catctccaga      600
gacaacgcca agaactccct gtatctgcaa atgaacagtc tgagagccga ggacacggcc      660
ttgtattact gtgcgagaga gcgtggctac gggtagcatg atccccatga ctactggggc      720
caaggcaccg tggtgaccgt ctctca                                     747
    
```

35

<210> 92  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

45

<400> 92

50

```

      Gly Phe Ser Val Ser Gly Thr Tyr Met Gly
      1           5           10
    
```

<210> 93  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

60

<400> 93

```

Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His Pro Ala Ser Leu Gln Gly
 1           5           10           15
    
```

65



ES 2 742 224 T3

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <400> 99

**Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser**  
 1 5

10 <210> 100  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 100

20 **Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Val**  
 1 5 10

<210> 101  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

30 <400> 101  
 actgggagca gctccaacat cggggcaggt tatgatgtac ac 42

<210> 102  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

40 <400> 102  
 ggtaacagca atcgccctc a 21

45 <210> 103  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Polinucleótido sintético

<400> 103  
 gcagcatggg atgacagcct gaatggtat gtc 33

55 <210> 104  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 104

65

ES 2 742 224 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly  
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ser Gly Thr  
 10 Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 15 Ala Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His Pro Ala Ser Leu Gln  
 20 Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu  
 25 Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 30 Lys Gly Gly Ala Gly Gly Gly His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 35 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

40 <210> 105  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 50 <400> 105

gaggtgcagc tggaggagac cggaggaggc ttgctccagc cggggggggtc cctcagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggggt ctccgtcagt ggcacctaca tgggctgggt ccgccaggct 120  
 55 ccaggaagg gactggagtg ggtgcactt ctttatagtg gtggcggcac ataccacca 180  
 gcgtccctgc agggccgatt catcgtctcc agagacagct ccaagaatat ggtctatctt 240  
 60 caaatgaata gcctgaaagc cgaggacacg gccgtctatt actgtgcgaa aggaggggca 300  
 ggaggtggcc actttgactc ctggggccaa ggcaccctgg tgaccgtctc ctca 354

65 <210> 106  
 <211> 112  
 <212> PRT

ES 2 742 224 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 106

10 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

15 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
20 25 30

20 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

25 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

30 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

35 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser  
85 90 95

40 Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 107

40 <211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Polinucleótido sintético

<400> 107

50 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctccagggctc 180

55 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc 240

cagtctgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gaatggttat 300

60 gtcttcggaa ctgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 108

<211> 251

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 742 224 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 108

5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

10

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
20 25 30

15

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

20

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

25

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

30

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser  
85 90 95

35

Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

40

Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
115 120 125

45

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

Ser Leu Glu Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu  
 130 135 140  
 5  
 Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 145 150 155 160  
 10  
 Ser Val Ser Gly Thr Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 165 170 175  
 15  
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His  
 180 185 190  
 20  
 Pro Ala Ser Leu Gln Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys  
 195 200 205  
 25  
 Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala  
 210 215 220  
 30  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Ala Gly Gly Gly His Phe Asp Ser  
 225 230 235 240  
 35  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 109

<211> 753

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

45

<400> 109

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

	cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgcaactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag	120
5	cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctccaggggtc	180
	cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	240
10	cagtctgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gaatggttat	300
	gtcttcggaa ctgggaccaa gctgaccgtc ctaggttcta gaggtggtgg tggtagcggc	360
	ggcggcggct ctggtggtgg tggatccctc gagatggccg aggtgcagct ggtggagacc	420
15	ggaggaggct tgctccagcc ggggggtcc ctcagactct cctgtgcagc ctctgggttc	480
	tccgtcagtg gcacctacat gggctgggtc cgccaggctc caggggaaggg actggagtgg	540
20	gtcgcacttc tttatagtgg tggcggcaca taccaccag cgtccctgca gggccgatc	600
	atcgtctcca gagacagctc caagaatatg gtctatcttc aatgaatag cctgaaagcc	660
25	gaggacacgg ccgtctatta ctgtgcgaaa ggaggggcag gaggtggcca ctttgactcc	720
	tggggccaag gcaccctggt gaccgtctcc tca	753

30 <210> 110  
 <211> 523  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 110

40

45

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

	Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
	1				5					10						15
5	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
				20					25					30		
10	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn
			35					40					45			
15	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		50					55					60				
20	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	65					70					75					80
25	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln
					85					90					95	
30	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
				100					105					110		
35	Asn	Gly	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ser
			115					120					125			
40	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		130					135					140				
45	Leu	Glu	Met	Ala	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys
	145					150					155					160
50	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser
					165					170					175	
55	Phe	Thr	Asn	Phe	Trp	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly
				180					185					190		
60																
65																

ES 2 742 224 T3

5 Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr  
 210 215 220  
 10 Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala  
 225 230 235 240  
 Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe  
 245 250 255  
 15 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 260 265 270  
 20 Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
 275 280 285  
 25 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 290 295 300  
 30 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 305 310 315 320  
 35 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp  
 325 330 335  
 40 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr  
 340 345 350  
 45 Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 355 360 365  
 50 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly  
 370 375 380  
 55 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr  
 405 410 415  
 60 Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
 420 425 430  
 65 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln  
 435 440 445

ES 2 742 224 T3

5 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val  
 450 455 460  
 Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 465 470 475 480  
 10 Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
 485 490 495  
 15 Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 500 505 510  
 20 Lys Val Glu Ile Lys His His His His His His  
 515 520  
 <210> 111  
 25 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 111  
 35 Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 40 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr  
 20 25 30  
 45 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile  
 35 40 45  
 50 Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 60 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu  
 85 90 95  
 65 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

ES 2 742 224 T3

<210> 112  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 112

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30

20

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

25

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

30

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

35

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

40

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

45

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 113  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

55

<400> 113

60

65

ES 2 742 224 T3

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

# ES 2 742 224 T3

<210> 114  
<211> 1503  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

10

<400> 114

caggctgtcg tgactcagcc tctttctgct tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60

tctgctcgc gtcctcctc caacatcggc tccaacaccg tgaactggtc tcagcaggtg 120

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

	ccccgcaccg	cccccaagct	gctgatctac	tctaacaacc	agcggccctc	cggcgtgccc	180
	gacagattct	ctggctctaa	gtccggcacc	tccgcctccc	tggctatctc	tggcctgcag	240
5	tctgaggacg	aggccgacta	ctactgcgcc	gcctgggacg	attctctgaa	cggtcgggtg	300
	ttcggcggag	gcaccaagct	gacagtgtct	ggaagtagag	gcggtggcgg	atctcgtggc	360
10	ggaggatctg	gcgagggggg	ctctctggaa	atggcccaga	tgcagctggt	gcagtctggc	420
	gccgaagtga	aagagcctgg	cgagtcctct	cggatctcct	gcaagggctc	cggtctacagc	480
15	tttaccact	tctggatcag	ctgggtgcga	cagatgcccg	gcaagggcct	ggaatggatg	540
	ggcagagtgg	accccgcta	ctcctactcc	acctaactcc	ccagcttcca	ggccaactg	600
	accatcagcg	ccgacaagtc	tacctccacc	gcctacctgc	agtggaactc	cctgaaggcc	660
20	tccgacaccg	ccatgtacta	ctgtgcccg	gtgcagtaca	gcccgtacta	cgattggctc	720
	gaccctggg	gccagggcac	cctcgtgaca	gtgtctagt	gccccggagg	atccgactg	780
25	cagctggtgc	agagcggagc	tgaagtgaag	aaacctggcg	cctccgtgaa	ggtgtcctgc	840
	aaagctagcg	gctatacctt	cacccggtac	accatgcact	gggtgcgcca	ggcacctgga	900
	cagggactgg	aatggatcgg	ctacatcaac	ccctcccggg	gctacaccaa	ctacgcccac	960
30	tctgtgaag	gccggttcac	catcaccacc	gataagtcca	ccagcaccgc	ttacatggaa	1020
	ctgtcctccc	tgagatccga	ggacaccgct	acctaactatt	gcgcccggta	ctacgaccac	1080
35	cactactgcc	tggactactg	gggacagga	accacagtga	ccgtgtctc	tggcgagggc	1140
	acctctactg	gatctggggg	aagtgggtgt	tctggcggcg	ctgacgacat	cgtgctgacc	1200
	cagtctccag	ccaccctgtc	tctgagccca	ggcgagagag	ctaccctgtc	ctgcagagcc	1260
40	tcccagtccg	tgtcctacat	gaattggtat	cagcagaagc	ctggcaaggc	ccctaagcgg	1320
	tggatctacg	acacctccaa	ggtggcctct	ggcgtgccag	cccggttttc	cggatctggc	1380
45	tctggcaccg	actactcctt	gaccatcaac	agcctggaag	ccgaggacgc	tgccacctat	1440
	tactgccagc	agtggctctc	caaccctctg	acctttggag	gcccacacaa	ggtggaaatc	1500
	aag						1503

50  
 <210> 115  
 <211> 1575  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

60  
 <400> 115

65

ES 2 742 224 T3

	atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcca ggctgtcgtg	60
5	actcagcctc cttctgcttc tggcaccctt ggccagagag tgaccatctc ctgctccggc	120
	tcctcctcca acatcggtc caacaccgtg aactggtatc agcaggtgcc cggcaccgcc	180
10	cccaagctgc tgatctactc taacaaccag cggcctccg gcgtgccca cagattctct	240
	ggctctaagt ccggcacctc cgctccctg gctatctctg gcctgcagtc tgaggacgag	300
	gccgactact actgcgccgc ctgggacgat tctctgaacg gctgggtgtt cggcggaggc	360
15	accaagctga cagtgcggg aagtagaggc ggtggcggat ctggtggcgg aggatctggc	420
	ggagggggct ctctggaat ggcccagatg cagctggtgc agtctggcgc cgaagtgaaa	480
20	gagcctggcg agtccctgcg gatctcctgc aagggtccg gctacagctt taccaacttc	540
	tggatcagct ggggtgcgaca gatgcccggc aagggcctgg aatggatggg cagagtggac	600
	cccggctact cctactccac ctactcccc agcttccagg gccacgtgac catcagcggc	660
25	gacaagtcta cctccaccgc ctacctgcag tggaaactcc tgaaggcctc cgacaccgcc	720
	atgtactact gtgccgggt gcagtacagc ggctactacg attggttoga ccctggggc	780
30	cagggcacc cctgtgacagt gtctagtggc gggggaggat ccgacgtgca gctggtgcag	840
	agcggagctg aagtgaagaa acctggcggc tccgtgaagg tgcctgcaa agctagcggc	900
	tataccttca cccggtacac catgcactgg gtgcgccagg cacctggaca gggactggaa	960
35	tggatcggct acatcaacc cctccggggc tacaccaact acgccgactc tgtgaagggc	1020
	cggttcacca tcaccaccga taagtccacc agcaccgctt acatggaact gtcctccctg	1080
40	agatccgagg acaccgctac ctactattgc gcccggtact acgacgacca ctactgcctg	1140
	gactactggg gacagggaac cacagtgacc gtgtcctctg gcgagggcac ctctactgga	1200
	tctgggggaa gtggtggttc tggcggcgt gaacacatcg tgctgacca gtctccagcc	1260
45	accctgtctc tgagcccagg cgagagagct accctgtcct gcagagcctc ccagtccgtg	1320
	tcctacatga attggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagcggtg gatctacgac	1380
50	acctccaagg tggcctctgg cgtgccagcc cggttttccg gatctggctc tggcaccgac	1440
	tactccctga ccatcaacag cctggaagcc gaggacgctg ccacctatta ctgccagcag	1500
	tggtoctcca accccctgac ctttggaggc ggcaccaagg tggaaatcaa gcaccaccat	1560
55	catcaccact gatag	1575

<210> 116  
 <211> 10  
 60 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 65 <400> 116

ES 2 742 224 T3

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Trp Ile Ser  
1 5 10

5 <210> 117  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético  
  
<400> 117

15 Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
1 5 10 15

<210> 118  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético  
  
25 <400> 118

Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Pro  
1 5 10

30 <210> 119  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

<400> 119  
ggatacagct tcaccaactt ctggatcagc 30

<210> 120  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

50 <400> 120  
agggttgatc ctggctactc ttatagcacc tacagcccgt cctccaagg c 51

<210> 121  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polinucleótido sintético

60 <400> 121  
gtacaatata gtggctacta tgactggttc gacccc 36

<210> 122  
<211> 13  
<212> PRT

ES 2 742 224 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

5 <400> 122

10 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn  
1 5 10

<210> 123  
<211> 7  
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <400> 123

25 Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 124  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 124

35 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val  
1 5 10

<210> 125  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

45 <400> 125  
tctggaagca gctccaacat cggaagtaat actgtaaac 39

50 <210> 126  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

<400> 126  
agtaataatc agcggccctc a 21

60 <210> 127  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Polinucleótido sintético

ES 2 742 224 T3

<400> 127  
gcagcatggg atgacagcct gaatggttgg gtg 33

5 <210> 128  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido sintético

<400> 128

15 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu  
1 5 10 15

20 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
20 25 30

25 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

30 Gly Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

35 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

40 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

45 Ala Arg Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly  
100 105 110

50 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

55 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

60

65

ES 2 742 224 T3

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

5 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

10 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190

15 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

20 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

25 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

30 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

35 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

40 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

45 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300

50 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

55 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

60 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

65 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

ES 2 742 224 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
405 410 415

5 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

10 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

15 Pro Gly Lys  
450

<210> 129

<211> 1356

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

25 <400> 129

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

```

cagatgcagc tggatgcagtc tggcgccgaa gtgaaagagc ctggcgagtc cctgcggatc      60
tcttgcaagg gctccggcta ctctttacc aacttctgga tcagctgggt gcgacagatg      120
cccggcaagg gcctggaatg gatgggcaga gtggaccccg gctacagcta ctccacctac      180
tccccagct  tccagggcca cgtgaccatc tccgcccaca agtctacctc caccgcctac      240
ctgcagtgga actccctgaa ggctccgac accgccatgt actactgccc cagagtgcag      300
tacagcggct actacgattg gttcgacccc tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtcc      360
tctgcttcca ccaagggccc atcggctctc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggccgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag      660
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc      780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac      900
gccagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga                                     1356

```

50  
55  
60  
65

```

<210> 130
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 130

```

ES 2 742 224 T3

1 Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 5 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 10 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 15 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 20 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 25 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 30 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 35 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
 40 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
 45 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys  
 50 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 55 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 60 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215

65 <210> 131  
 <211> 651

ES 2 742 224 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 131

```

10      caggctgtcg tgactcagcc tccttctgct tctggcacc ctggccagag agtgaccatc      60
      tectgtccg gctcctcctc caacatoggc tccaacaccg tgaactggta tcagcaggtg      120
      cccggcaccg cccccaagct gctgatctac tctaacaacc agcggcctc cggcgtgcc      180
15      gacagattct ctggctctaa gtcggcacc tccgcctccc tggctatctc tggcctgcag      240
      tctgaggacg aggccgacta ctactgcgcc gcctgggacg attctctgaa cggtgggtg      300
      ttggcgggag gcaccaagct gacagtgctg ggcagccta aggcccaacc taccgtgacc      360
20      ctgttcccc catcctcoga ggaactgcag gctaacaagg ccaccctcgt gtgcctgatc      420
      tccgacttct accctggcgc cgtgaccgtg gcctggaag ctgatggatc tctgtgaag      480
      gccggcgtgg aaaccaccaa gccctccaag cagtccaaca acaatacgc cgctcctcc      540
25      tacctgtccc tgaccctga gcagtggaag tcccaccggt cctacagctg ccaagtgacc      600
      cacgagggct ccaccgtgga aaagaccgtg gctcctaccg agtgctccta g      651
  
```

<210> 132  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 132

```

40      Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
      1          5          10          15
      .....
45      Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
      .....
      20          25          30
  
```

50

55

60

65

ES 2 742 224 T3

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

<210> 133  
 <211> 759  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 133

ES 2 742 224 T3

5  
10  
15  
20

```

caggctgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcaggtc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccag      240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtgggtg tagcggcggc      360
ggcggctctg gtggtgggtg atccctcgag atggcccaga tgcagctggt gcagtccgga      420
gcagaggtga aagagcccgg ggagtctctg aggatctcct gtaagggttc tggatacagc      480
ttcaccaact tctggatcag ctgggtgctc cagatgcccg gaaaggcct ggagtggatg      540
gggaggggtg atcctggcta ctcttatagc acctacagcc cgtccttcca aggccacgct      600
accatctcag ctgacaagtc taccagcact gcctacctgc agtggaacag cctgaaggcc      660
tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga gtacaatata gtggctacta tgactggttc      720
gaccctggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctca      759

```

25  
30

```

<210> 134
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 134

```

35  
40  
45  
50  
55

```

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

```

60  
65

ES 2 742 224 T3

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

5 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

10 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

15 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

20 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

25 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

30 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

35 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

40 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

45 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

50 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

55 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

60

65

ES 2 742 224 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 5  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 10  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 15  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 20  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 25  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445  
 Lys

<210> 135  
 <211> 1350  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 35  
 <400> 135

40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 742 224 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc cggcggcggc gtgggtgcagc ccggccggtc cctgcggctg 60  
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cggtaacca tgcaactgggt gggcaggcc 120  
 5 cccggcaagg gcctggagtg gatcggctac atcaaccct cccggggcta caccaactac 180  
 aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgccttc 240  
 ctgcagatgg actccctggg gcccgaggac accggcgtgt acttctgcgc ccggtactac 300  
 10 gacgaccact actgcctgga ctactggggc cagggcacc cctgaccgt gtcctccgcc 360  
 tccaaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420  
 acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480  
 15 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg cctgctaca gtcctcagga 540  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggac ccagacctac 600  
 atctgcaacg tgaatcacia gcccgacaac accaagggtg acaagagagt tgagcccaa 660  
 20 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720  
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctccg gaccctgag 780  
 25 gtccatgcg tgggtgtgga cgtgaccac gaagaccctg aggtcaagt caactggtac 840  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccg gggaggagca gtaccaccg 900  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960  
 30 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020  
 gccaaagggc agccccgaga accacagggt tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080  
 35 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 1140  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccaccg tcccgtgctg 1200  
 gactccgacg gctccttct cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260  
 40 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacaccgag 1320  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

45 <210> 136  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 136

55

60

65

ES 2 742 224 T3

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

- <210> 137
- <211> 642
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Polinucleótido sintético
- <400> 137

ES 2 742 224 T3

gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcca ccgggtgacc 60  
 atcaactgct cgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtaccagca gacccccggc 120  
 5 aaggccccca agcgggtgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccgg 180  
 ttctccggct ccggctccgg caccgactac accttcacca tctcctcct gcagcccgag 240  
 gacatcgcca cctactactg ccagcagtgg tcctccaacc ccttcacctt cggccagggc 300  
 10 accaagctgc agatcaccog gaccgtggcc gcccctccg tgttcattt cccccctcc 360  
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420  
 15 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctcccaggag 480  
 tccgtgaccg agcaggactc caaggactcc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 540  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg 600  
 20 tcctccccog tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgt ag 642

--- ---

<210> 138  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <400> 138

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu  
 1 5

35 <210> 139  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45 <400> 139

Leu Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys  
 1 5

50 <210> 140  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60 <400> 140

Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu  
 1 5 10

65 <210> 141  
 <211> 9  
 <212> PRT

# ES 2 742 224 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 141

Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val  
1 5

10 <210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 142

20

Gln Leu Gln Asn Pro Ser Tyr Asp Lys  
1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

## 1. Un anticuerpo recombinante que comprende:

- 5 (I) una primera parte de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a WT1 / HLA, que comprende uno de:
- 10 (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOS: 54, 18, 36, 72, 90, 108 y 132; o
- 15 (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde VH y VL, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: (i) 50 y 52; (ii) 14 y 16; (iii) 32 y 34; (iv) 68 y 70; (v) 86 y 88; (vi) 104 y 106; y (vii) 128 y 130; o
- 20 (C)
- (i) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 40; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 45; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 46;
- 25 (ii) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;
- 30 (iii) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 22; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28;
- 35 (iv) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 56; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 58; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64;
- 40 (v) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 74; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 76; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82; o
- 45 (vi) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 92; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 94; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 99; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 100;
- 50 y
- 55 (II) una segunda porción de unión a antígeno que comprende:
- 60 (A) un fragmento variable de cadena única (scFV) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113; o
- 65 (B) un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde VH y VL,

respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 112 y 111 o una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NOS: 134 y 136.

- 5
2. El anticuerpo recombinante de la reivindicación 1, en el que:
- (I) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:
- 10 (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 16; o  
 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; una VH CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 4; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10;
- 15
- (II) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:
- 20 (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34; o  
 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 21; una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 27; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28;
- 25
- (III) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:
- 30 (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 54; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 50 y una VL que comprende el amino secuencias ácidas establecidas en SEQ ID NO: 52; o  
 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39; una VH CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 40; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 44; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 45; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 46;
- 35
- (IV) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:
- 40 (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 72; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 70; o  
 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 56; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57; una VH CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 58; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64;
- 45
- (V) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:
- 50 (A) un scFV que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 90; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 88; o  
 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 74; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75; una VH CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 76; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82; o
- 55
- 60
- 65

(VI) la primera porción de unión a antígeno comprende uno de:

- 5 (A) un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 108; o  
 (B) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 106; o  
 10 (C) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 92; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93; una VH CDR3 que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en la SEQ ID NO: 94; una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 99; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 100.

15 **3.** El anticuerpo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha primera porción de unión a antígeno y/o dicha segunda porción de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab; un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)<sub>2</sub>; un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de la bisagra; un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; y un scFv, preferiblemente en el que dicha primera porción de unión a antígeno y/o dicha segunda porción de unión a antígeno es un scFv.

25 **4.** El anticuerpo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha primera porción de unión a antígeno se une específicamente a WT1/HLA y dicha segunda porción de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno de superficie de células efectoras inmunes, opcionalmente en donde:

- (a) dicha célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en células asesinas naturales (NK), macrófagos y células T; o  
 (b) dicha célula efectora inmune es una célula CD3<sup>+</sup> y el anticuerpo recombinante se une específicamente a CD3.

30 **5.** El anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo recombinante:

- (a) se une a una célula WT1/HLA2<sup>+</sup>, opcionalmente en donde la célula WT1/HLA2<sup>+</sup> tiene una baja densidad de WT1/HLA2 en su superficie; y  
 35 (b) se une específicamente a CD3, opcionalmente en donde dicho anticuerpo recombinante se une a una célula CD3<sup>+</sup>.

40 **6.** El anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 110.

**7.** Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

45 **8.** Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el ácido nucleico de la reivindicación 7.

50 **9.** El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para uso en un método para tratar una enfermedad positiva para WT1 en un sujeto en el que la enfermedad positiva para WT1 es una leucemia crónica o leucemia aguda o cáncer WT1<sup>+</sup>, opcionalmente en el que la enfermedad positiva para WT1 se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple (MM), leucemia linfoblástica aguda (LLA), mieloides aguda/leucemia mielógena (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cánceres gastrointestinales, cáncer de mama, cáncer de próstata y glioblastoma.

55 **10.** El anticuerpo o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además administrar al sujeto una célula efectora inmunitaria, en donde opcionalmente la célula efectora inmune es una célula citotóxica, una célula T citotóxica CD3<sup>+</sup> o una célula T citotóxica CD3<sup>+</sup> autóloga.

60 **11.** Un anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en un método para estimular una respuesta de células T primaria y una respuesta secundaria de células T en un sujeto que comprende administrar una composición que comprende el anticuerpo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la respuesta de las células T primarias comprende estimular las células T citotóxicas contra el primer antígeno tumoral, y en donde la respuesta de las células T secundarias comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el primer antígeno tumoral y/o contra un segundo antígeno tumoral.

65 **12.** El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el primer antígeno tumoral es WT1/HLA y el segundo antígeno tumoral es un antígeno tumoral no WT1-RMF, opcionalmente en el que el antígeno tumoral no WT1-

RMF se selecciona del grupo formado por HER2-neu, mesotelina, Terc, Muc 16, Muc 1, PSMA y Pr1.

**13.** El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12:

5 (I) en donde la respuesta de las células T secundarias:

(a) no requiere células presentadoras de antígeno o moléculas coestimuladoras;

(b) comprende estimular células T efectoras y/o células T de memoria contra el segundo antígeno tumoral;

10 (c) comprende un aumento en las células T CD8;

(d) dura más de una semana; y/o

(e) comprende células T que antes eran anérgicas y/o células T activadas previamente con un antígeno no WT1-RMF.

15 **14.** El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que la respuesta de las células T primarias y/o la respuesta secundaria. La respuesta de las células T comprende un aumento en las células T en un sitio del tumor, opcionalmente en donde el sitio del tumor se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, pulmón, hígado, cerebro, tracto genitourinario, tracto gastrointestinal y bazo.

20

25

30

35

40

45

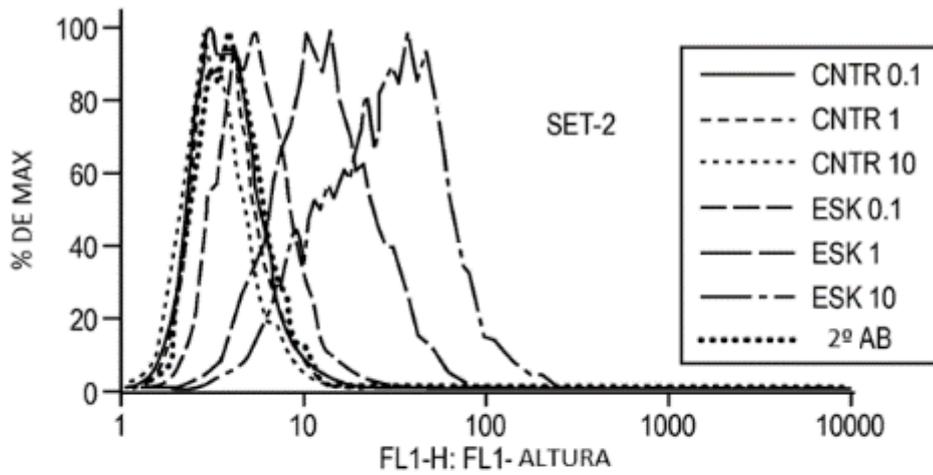
50

55

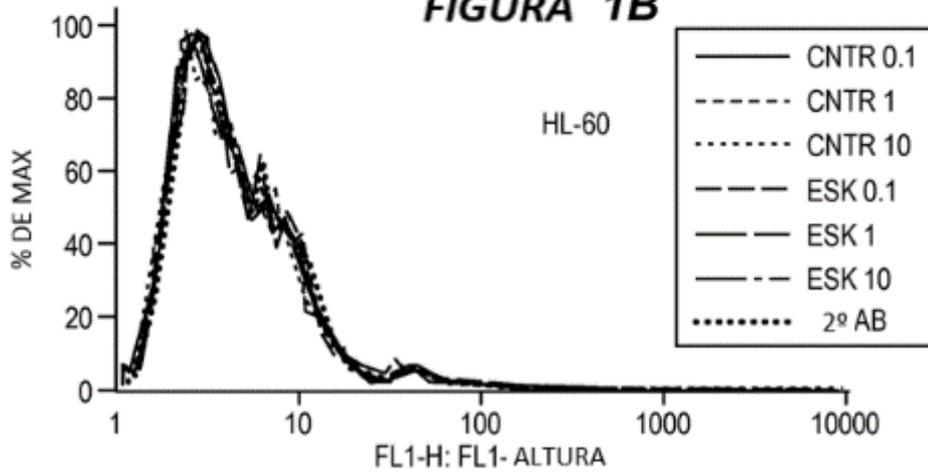
60

65

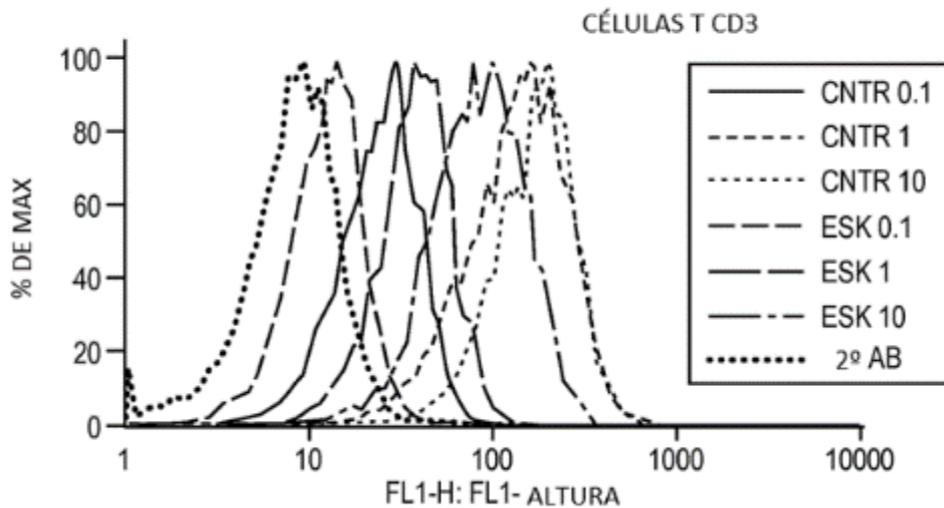
**FIGURA 1A**

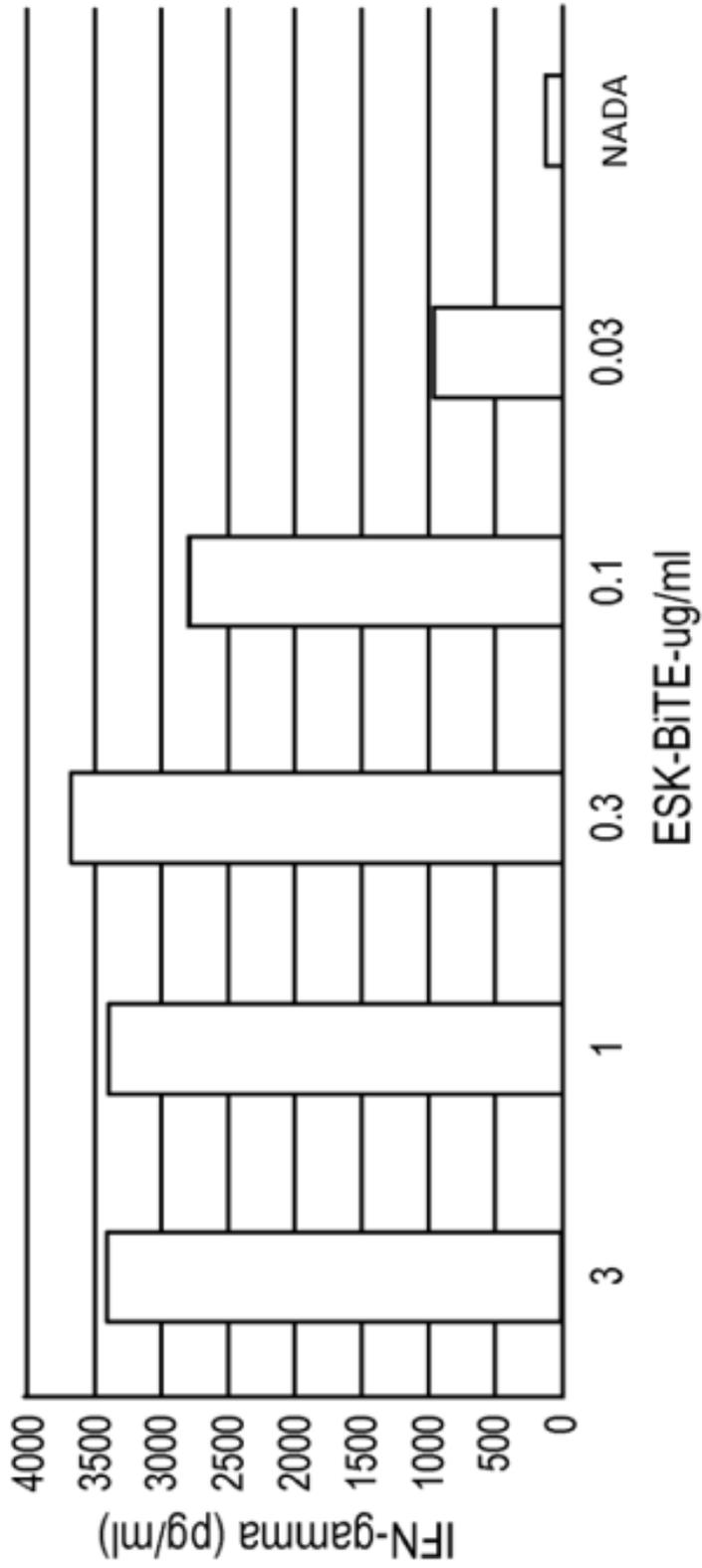


**FIGURA 1B**



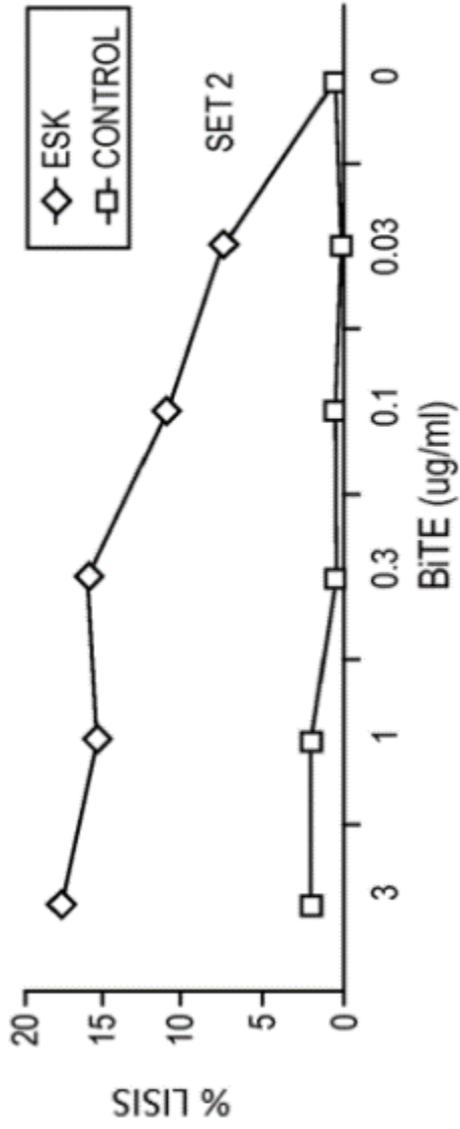
**FIGURA 1C**





**FIGURA 1D**

**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**

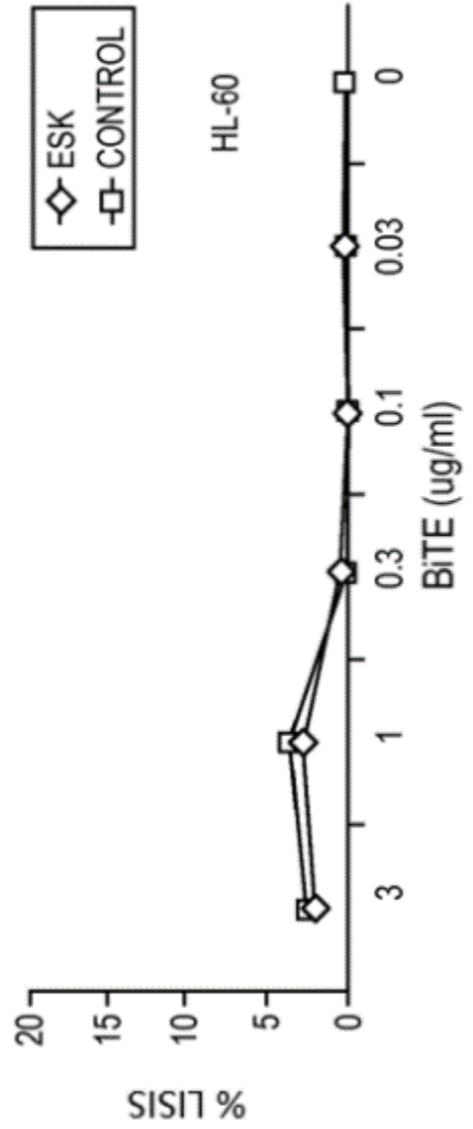


FIGURA 2C

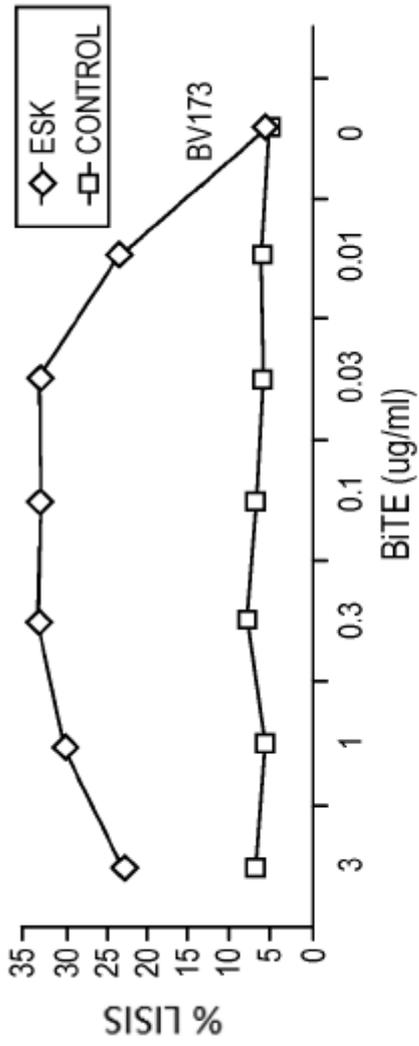
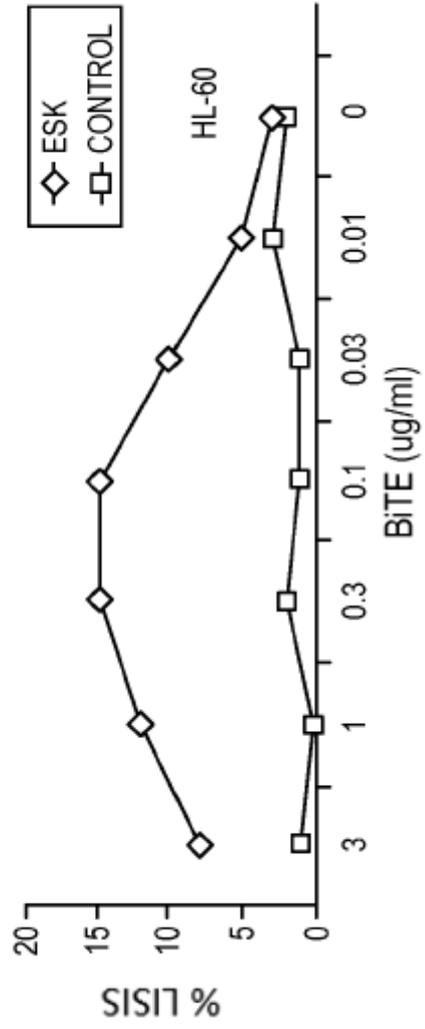
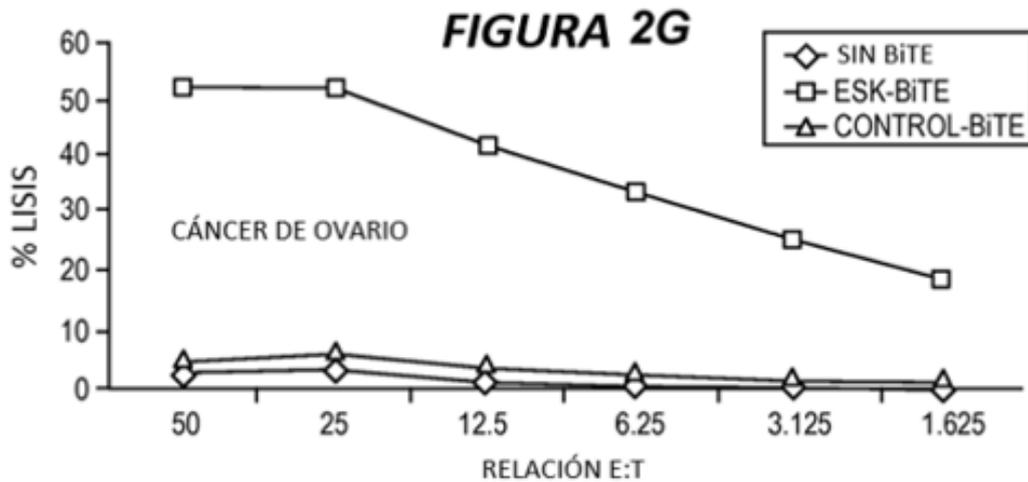
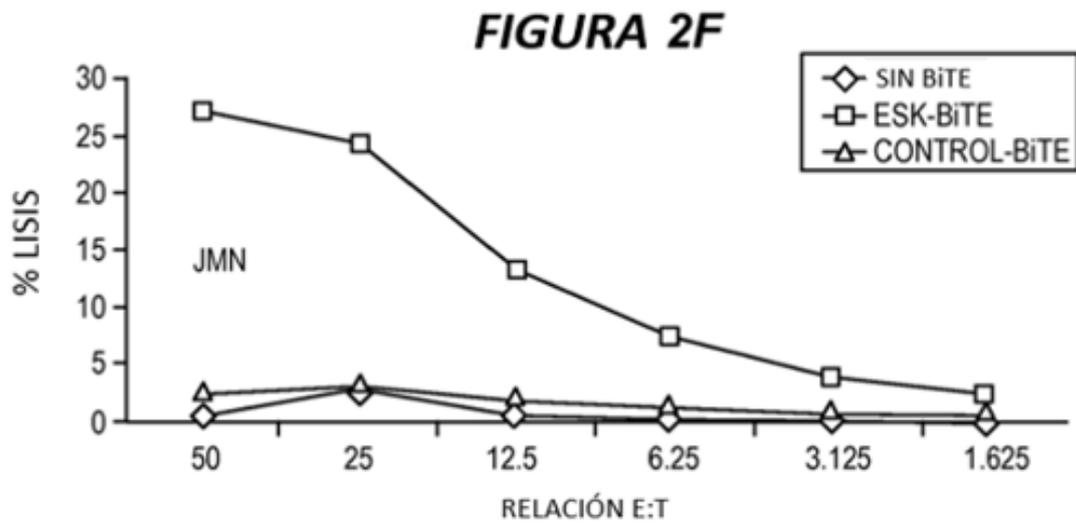
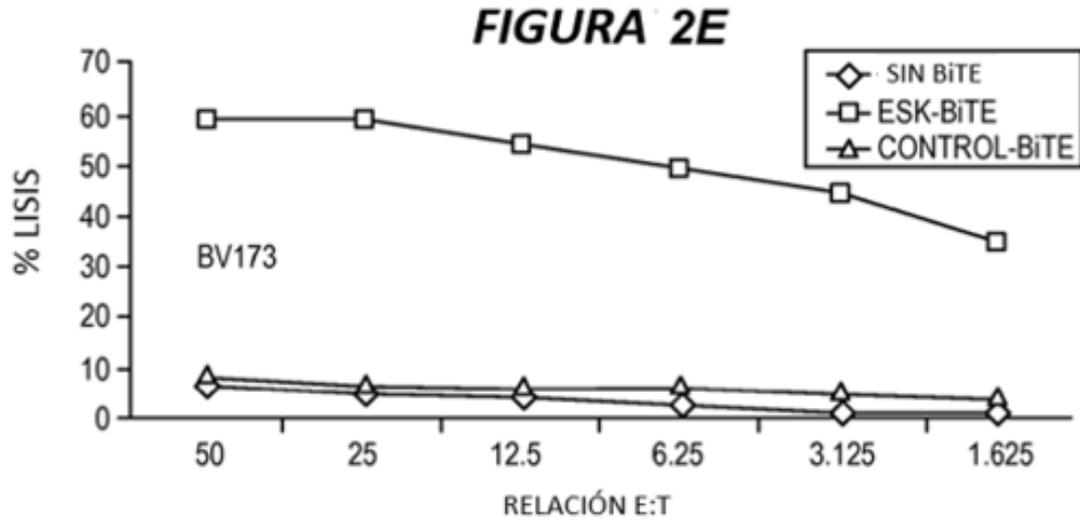
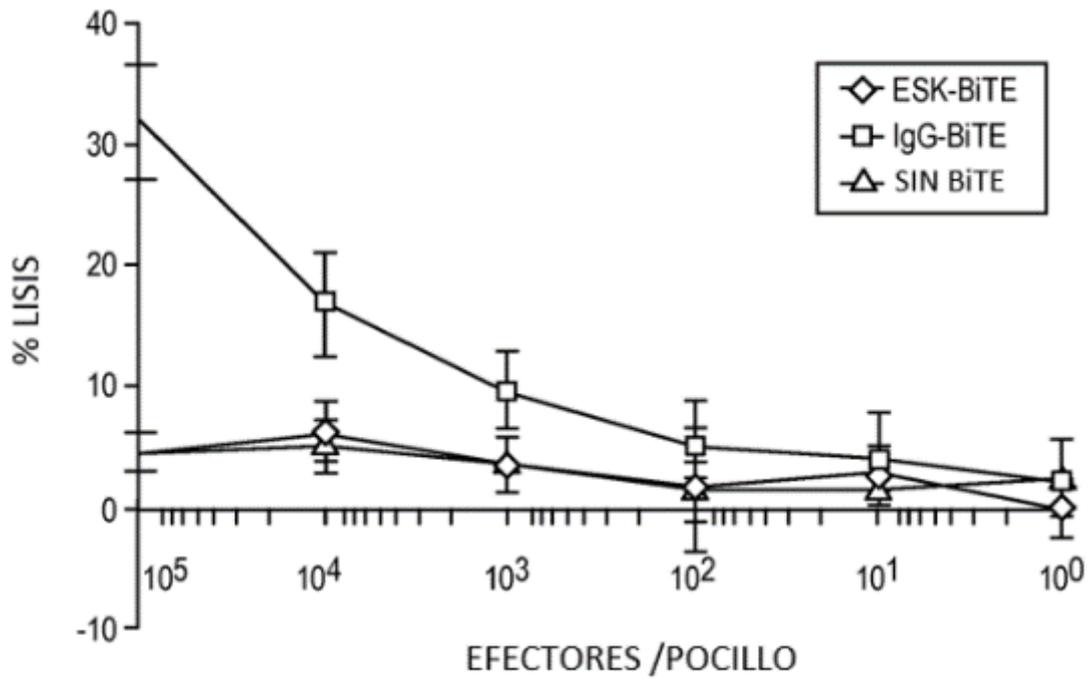


FIGURA 2D







**FIGURA 3A**

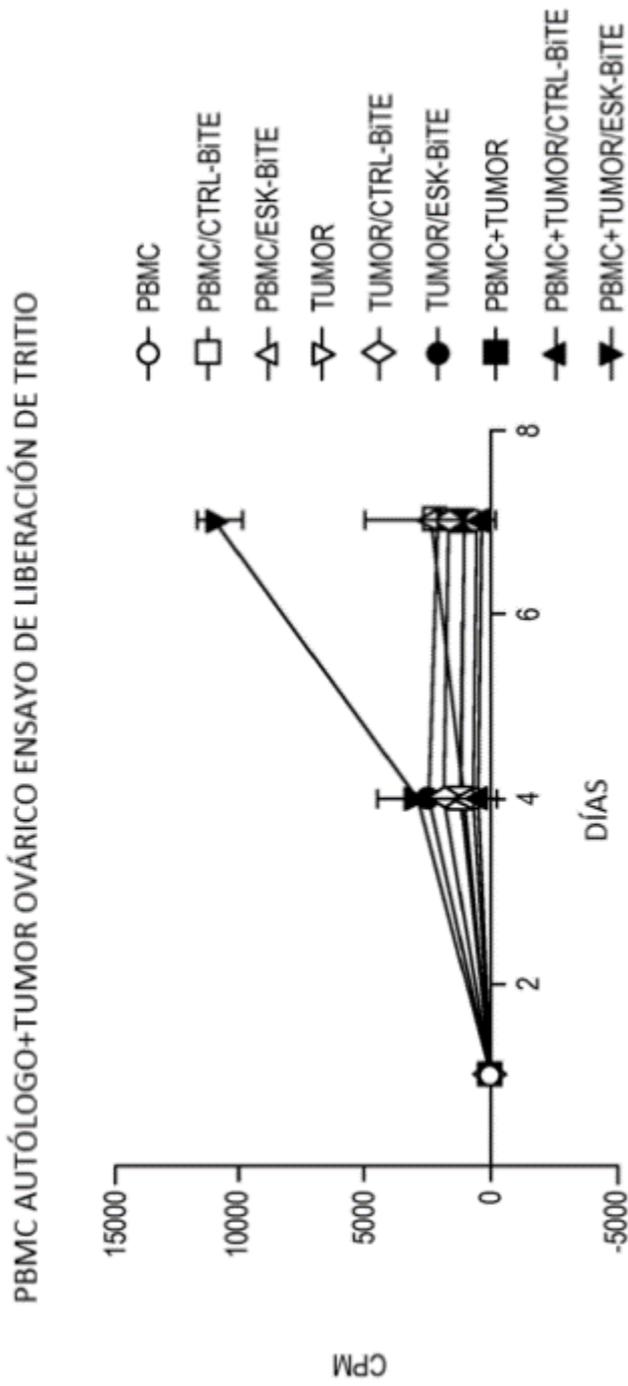
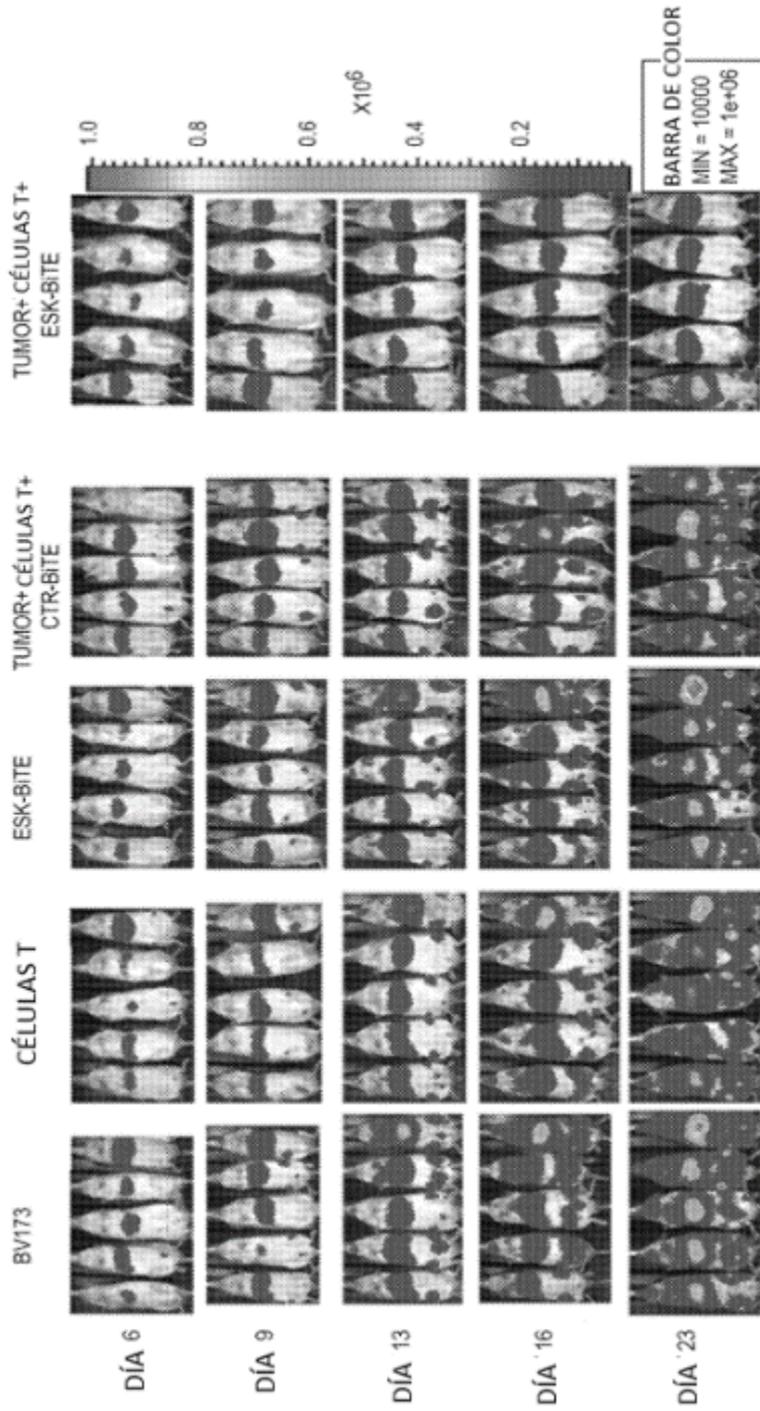


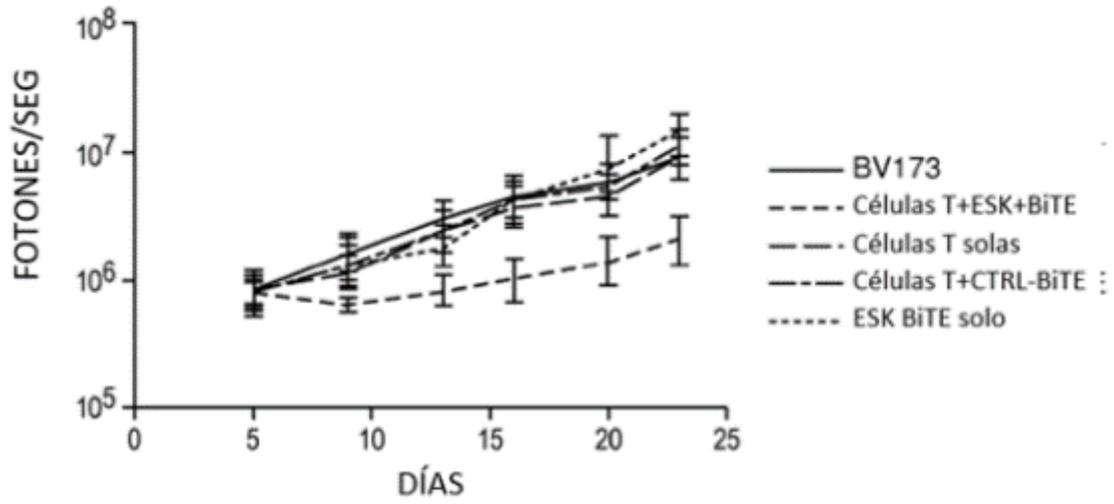
FIGURA 3B

**FIGURA 4A**



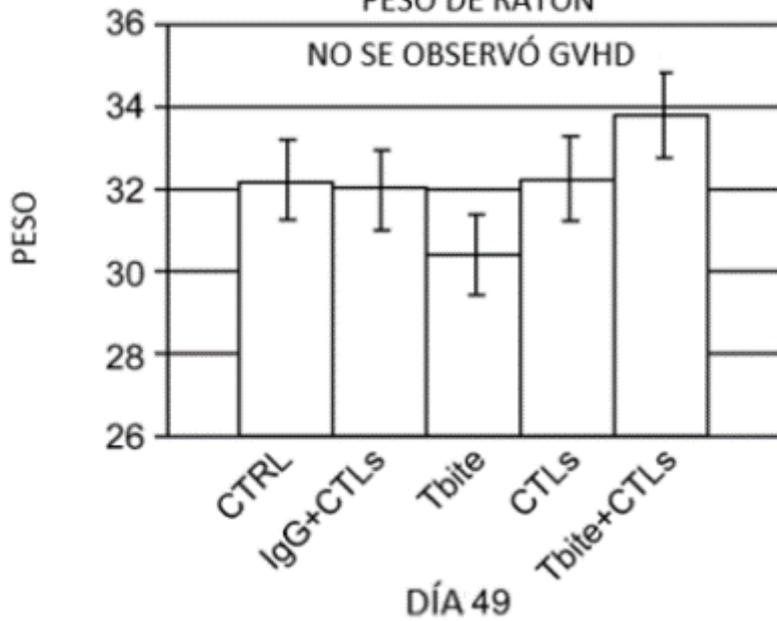
**FIGURA 4B**

BV173

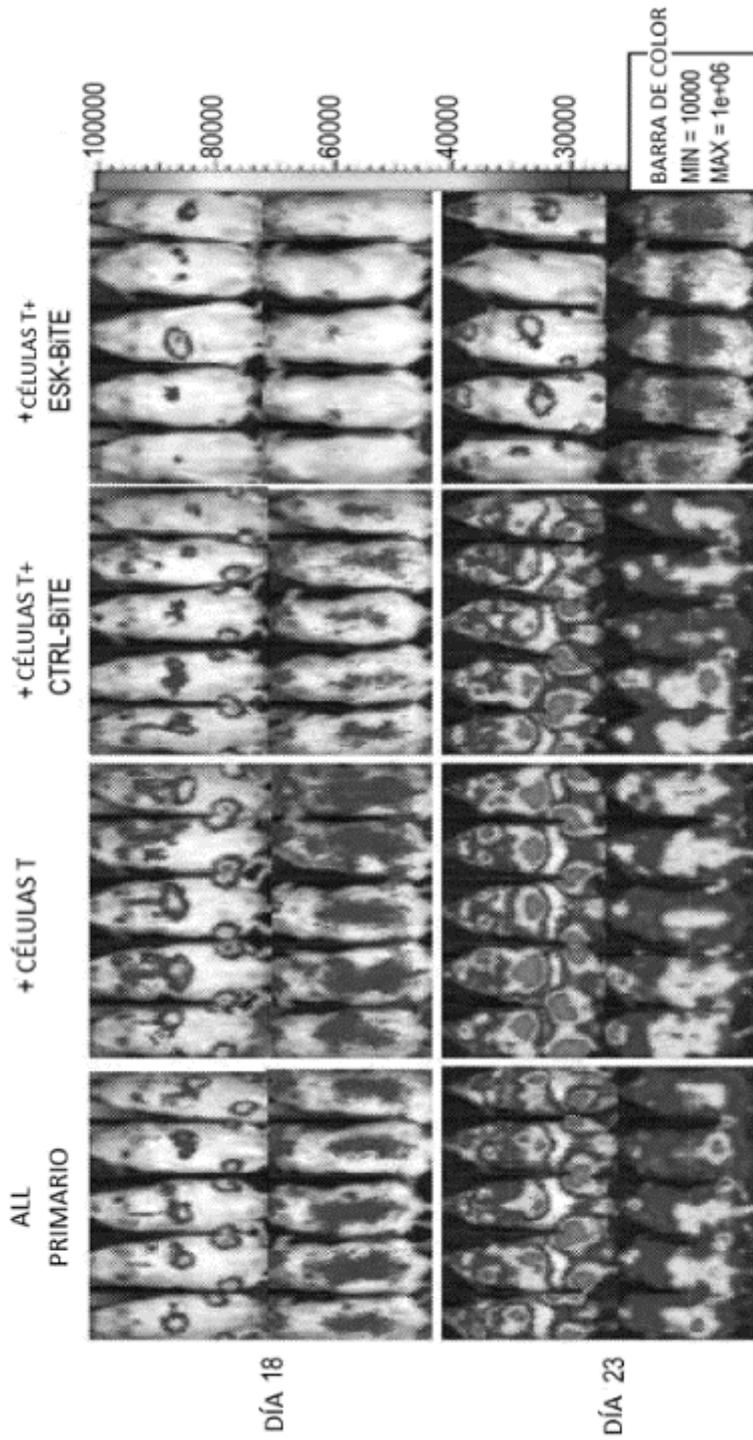


**FIGURA 4C**

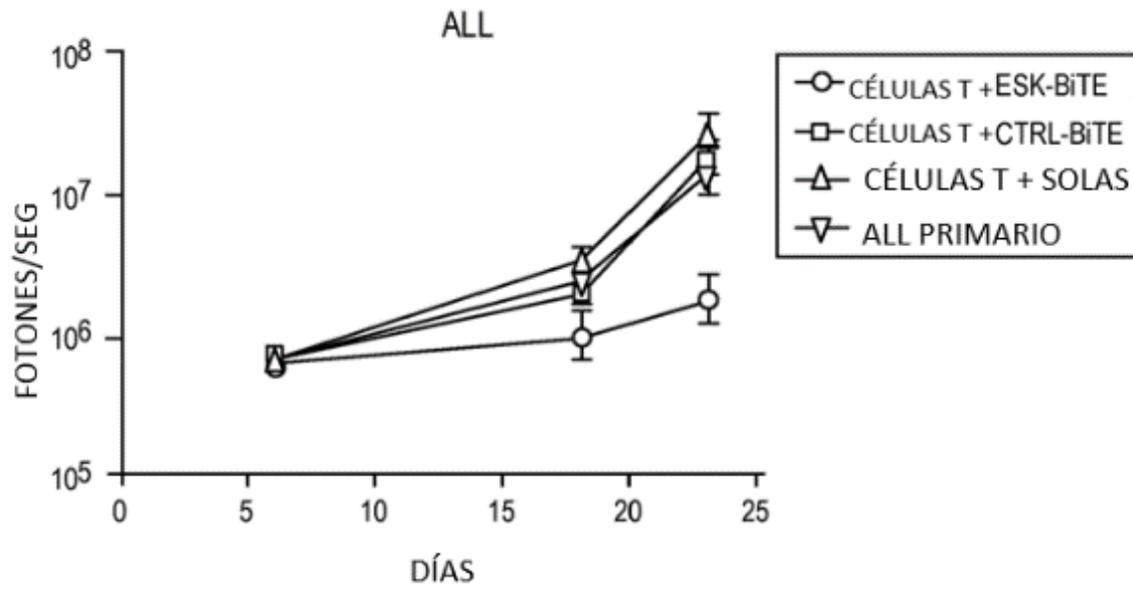
PESO DE RATÓN



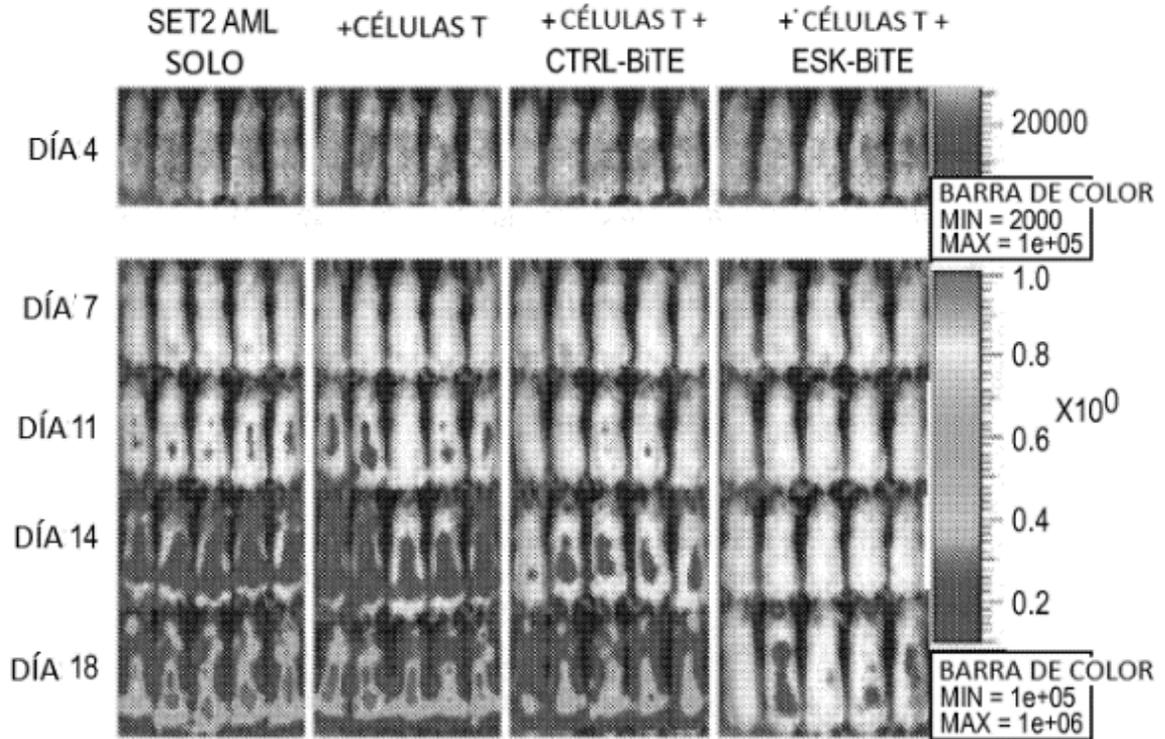
**FIGURA 4D**



**FIGURA 4E**

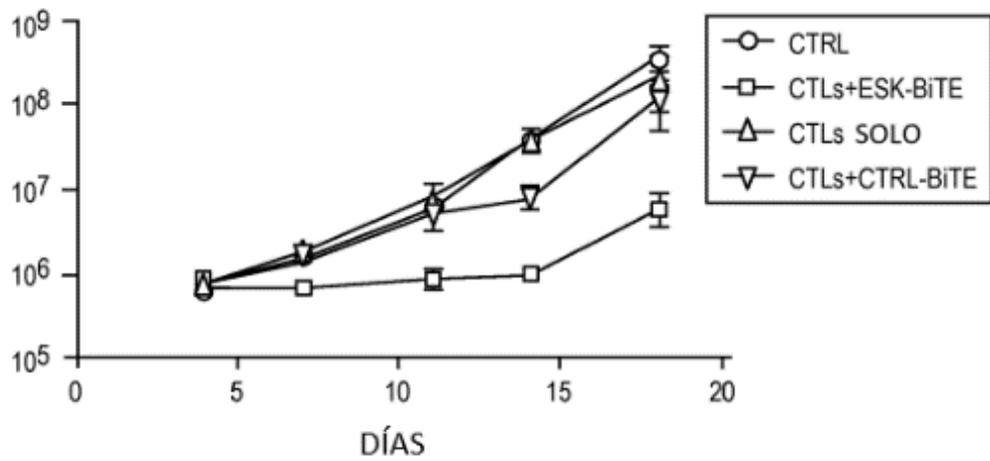


**FIGURA 5A**

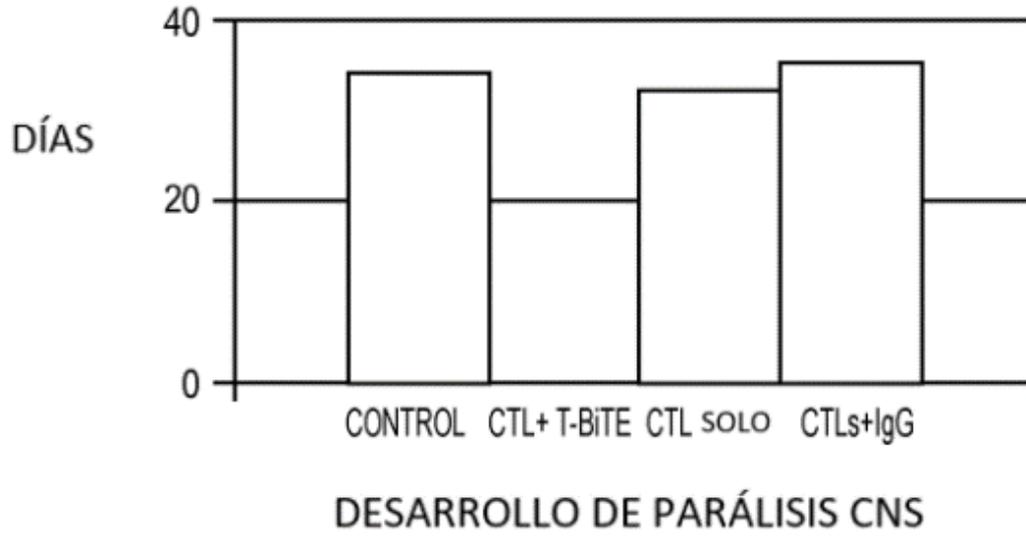


**FIGURA 5B**

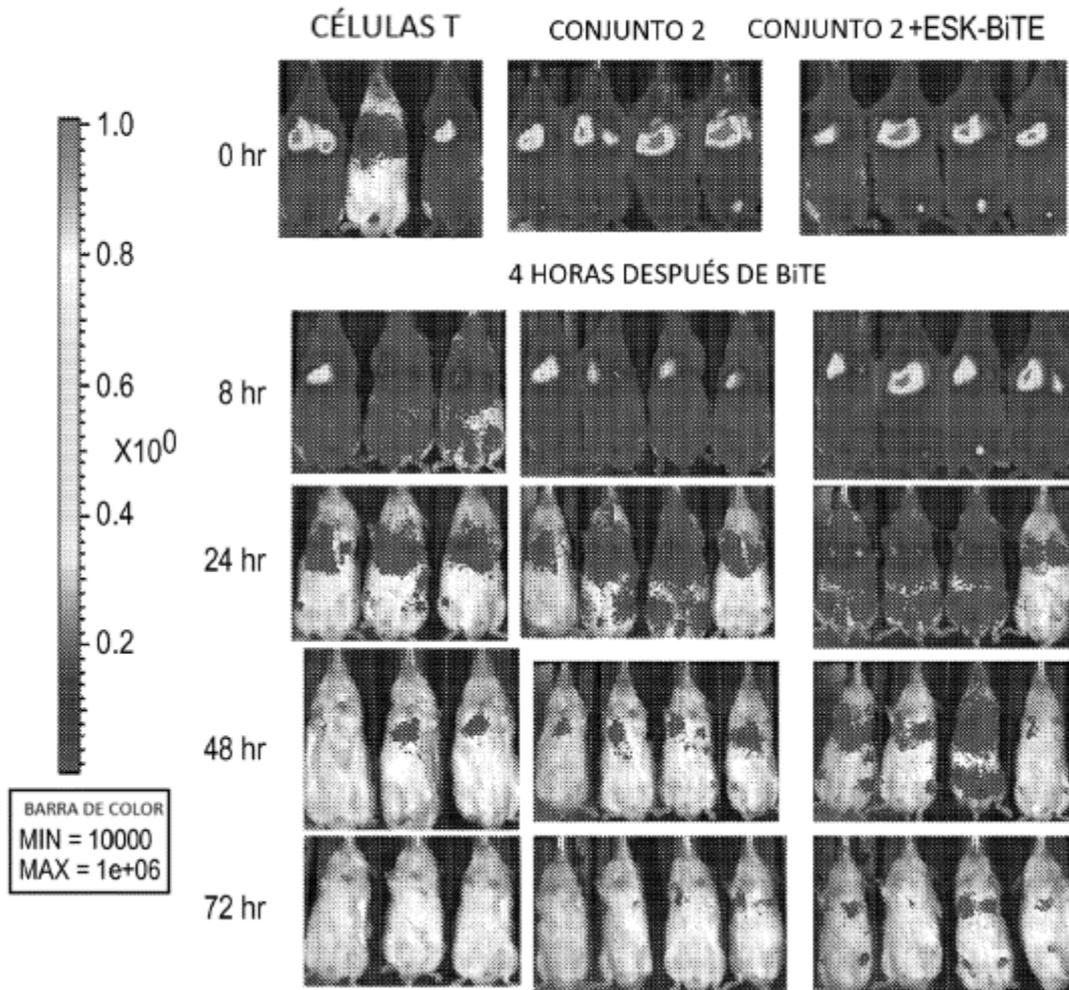
CONJUNTO 2



**FIGURA 5C**

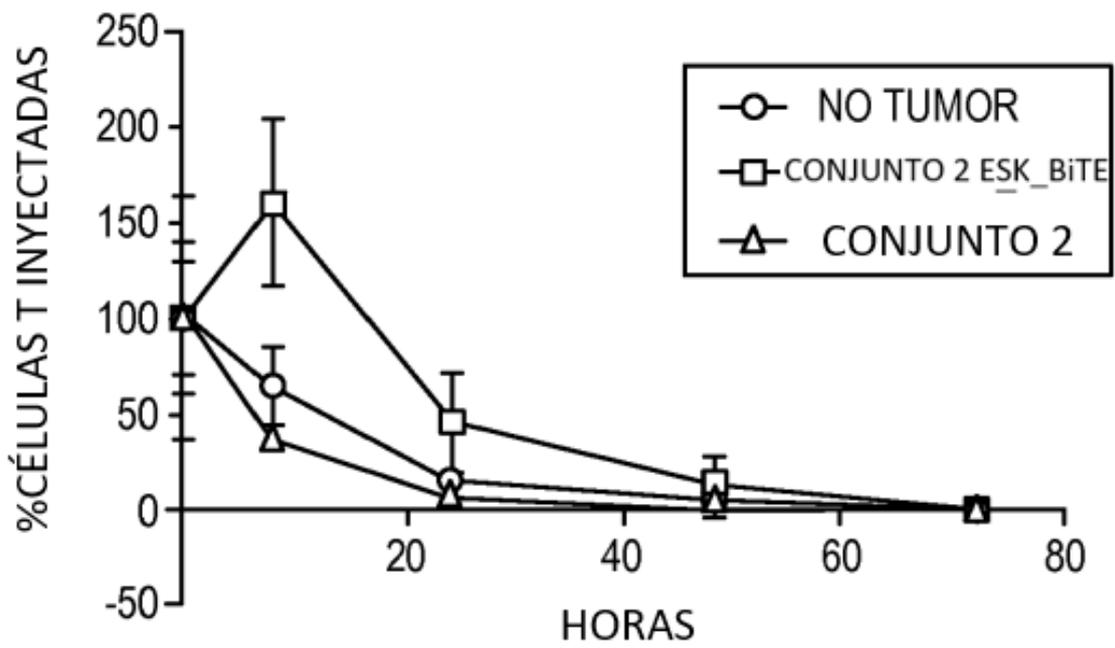


**FIGURA 6A**

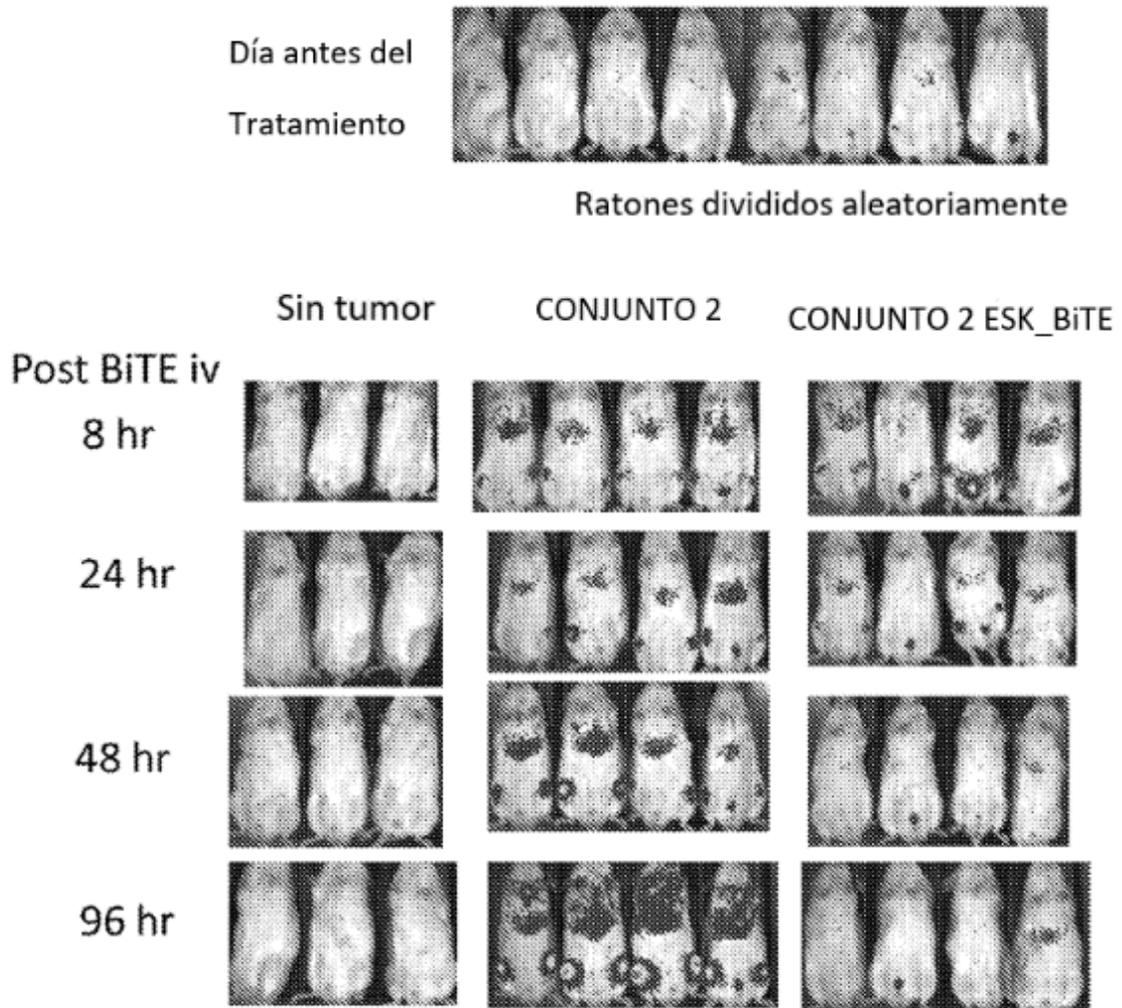


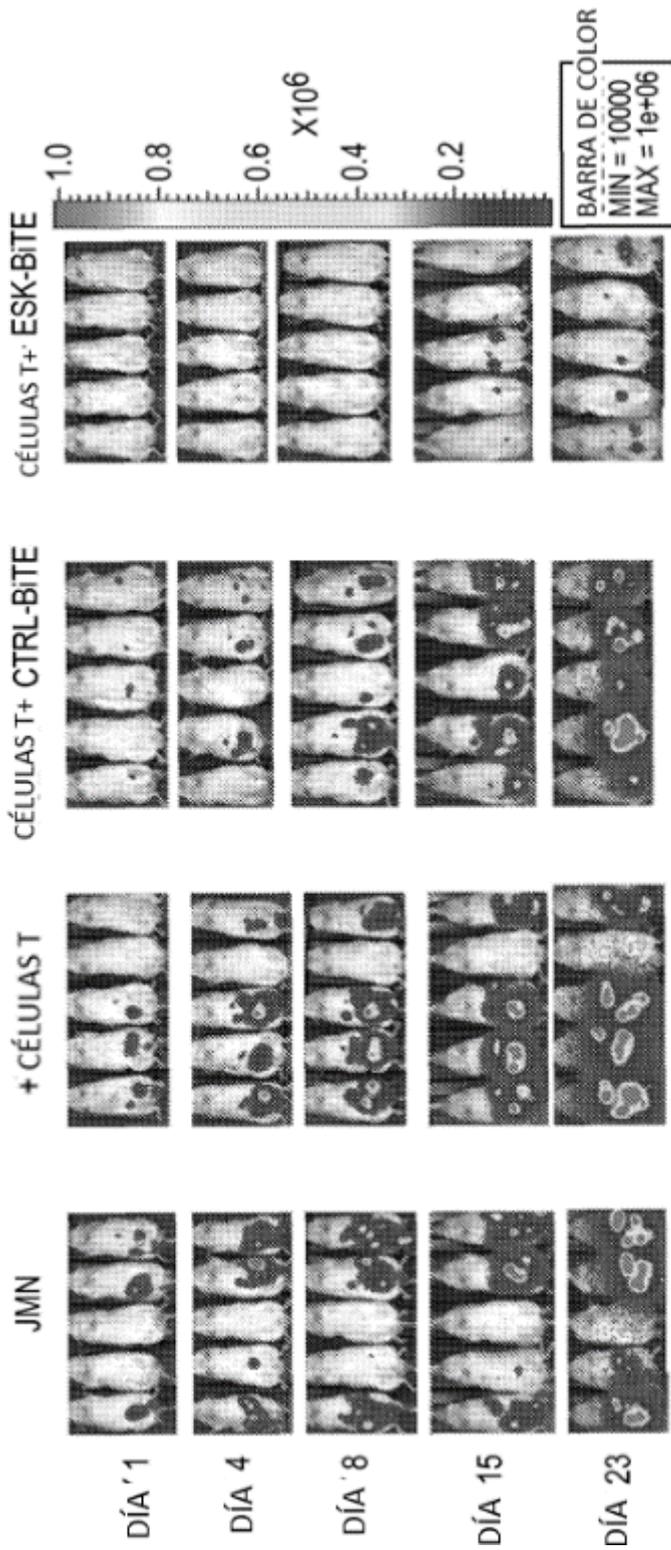
## FIGURA 6B

### CONJUNTO 2 CTLs RENILLA



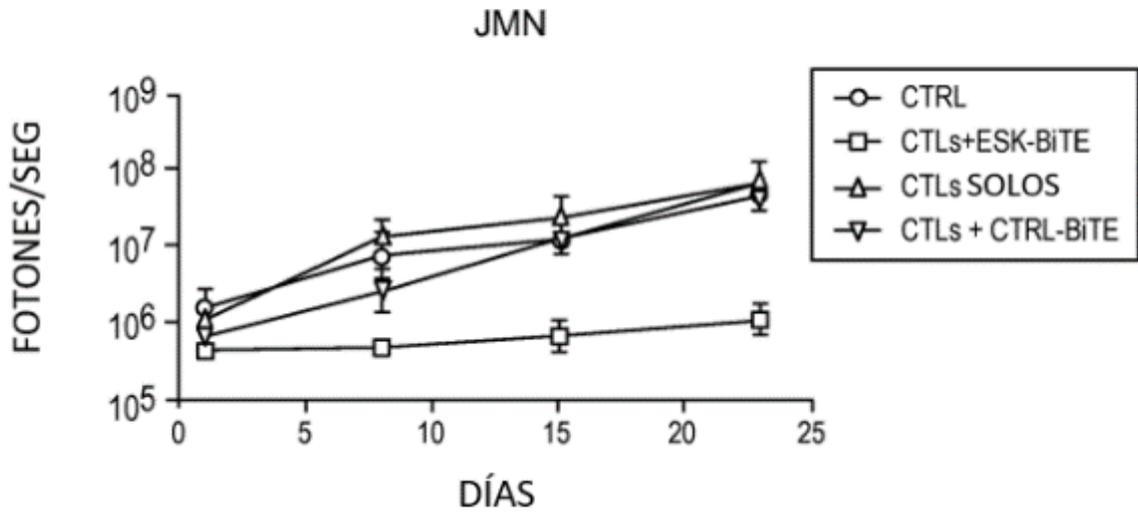
**FIGURA 6C**

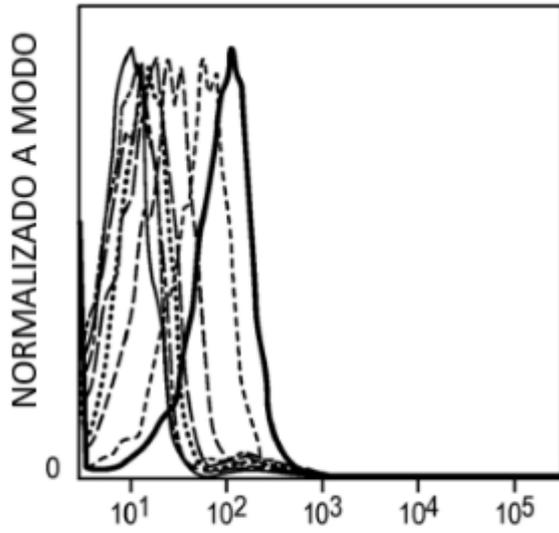




**FIGURA 7A**

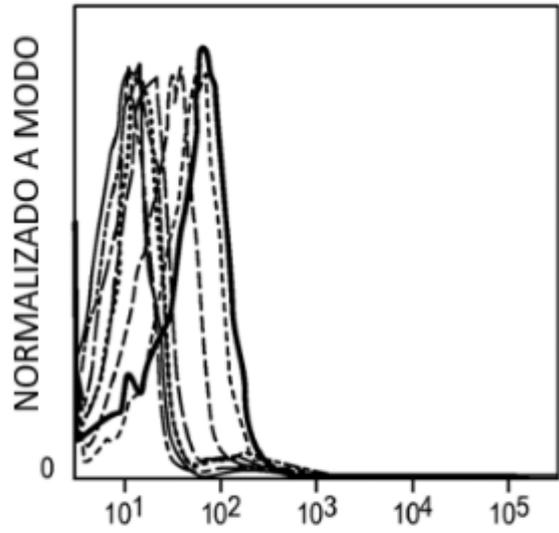
**FIGURA 7B**





GRN-HLin: FLUORESCENCIA VERDE (GRN-HLin)

	NOMBRE DE MUESTRA	MEDIA GEOM.
—	A5 ESK1+L2K 10.fcs	71.6
- - - -	B5 ESK1+L2K 3.3.fcs	47.9
- - - -	C5 ESK1+L2K 1.1.fcs	21.9
- - - -	D5 ESK1+L2K 0.37.fcs	14.5
· · · · ·	E5 ESK1+L2K 0.12.fcs	15.2
- - - -	F5 ESK1+L2K 0.04.fcs	10.7
- - - -	A2 antiHisFITC.fcs	10.3
—	A1 Jurkat.fcs	8.98

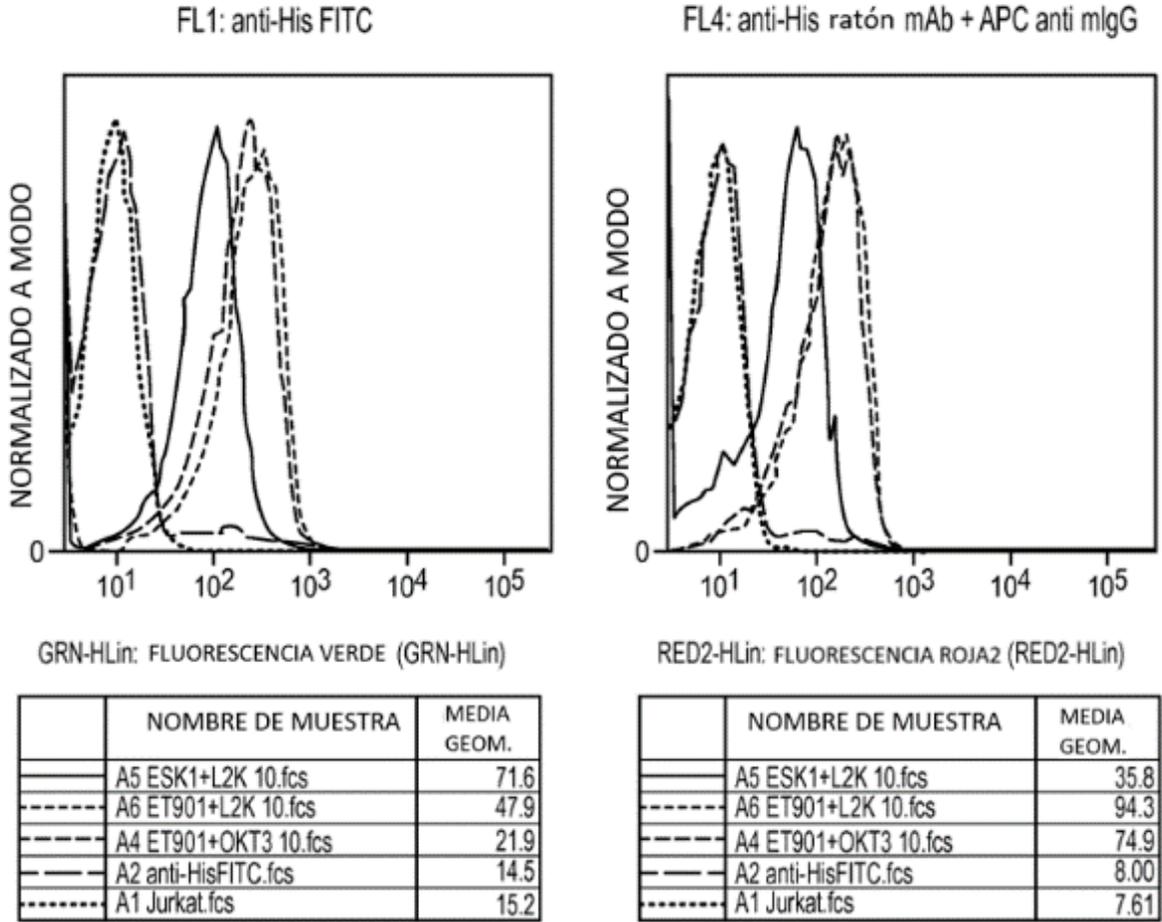


RED 2-HLin: FLUORESCENCIA ROJA2 (RED2-HLin)

	NOMBRE DE MUESTRA	MEDIA GEOM.
—	A5 ESK1+L2K 10.fcs	35.8
- - - -	B5 ESK1+L2K 3.3.fcs	36.2
- - - -	C5 ESK1+L2K 1.1.fcs	21.8
- - - -	D5 ESK1+L2K 0.37.fcs	13.9
· · · · ·	E5 ESK1+L2K 0.12.fcs	12.4
- - - -	F5 ESK1+L2K 0.04.fcs	9.99
- - - -	A2 antiHis+ADC-mIgG.fcs	0.45
—	A1 Jurkat.fcs	7.61

**FIGURA 8**

**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

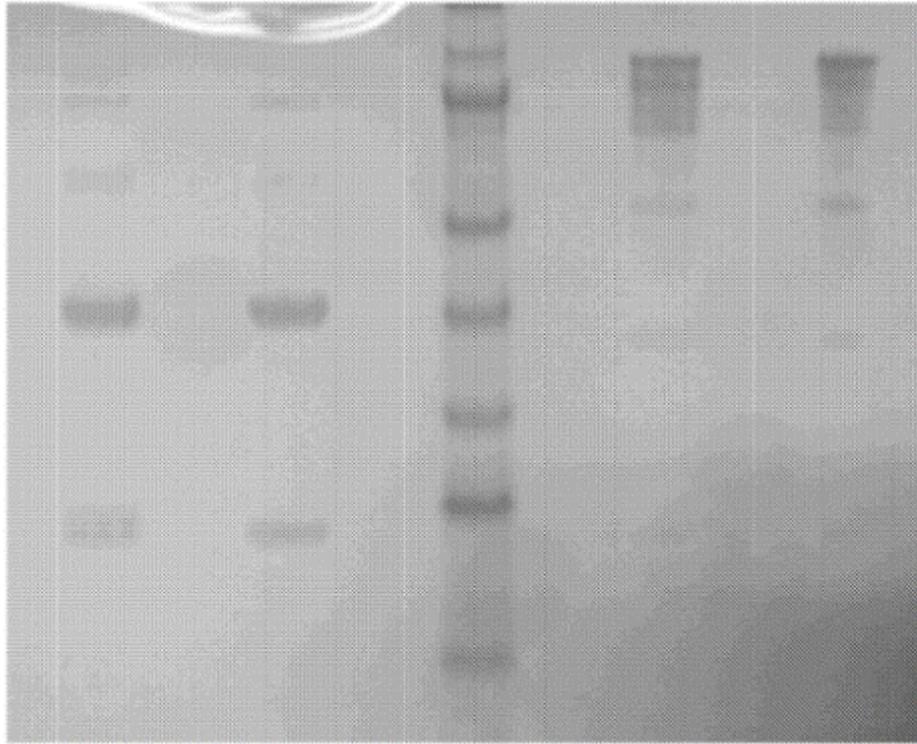
SECUENCIA ESK1-T BiTE AA

MGWSCIIILFLVATATGQAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQ  
QVPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAW  
DDSLNGWVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSLEMAQMQLVQSGAE  
VKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYSYSTYSPS  
FQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYICARVQYSGYYDWFDPWGQG  
TLVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQA  
PGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYC  
ARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGGSGGGGADDIVLTOSPATLS  
LSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSG  
SGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIKHHHHHH\*\*

Péptido señal Región variable de cadena ligera enlazador1 Región variable  
de cadena pesada ESK1 enlazador2 Región variable de cadena pesada L2K  
enlazador3 Región variable de cadena ligera L2K Etiqueta His

**FIGURA 11A**

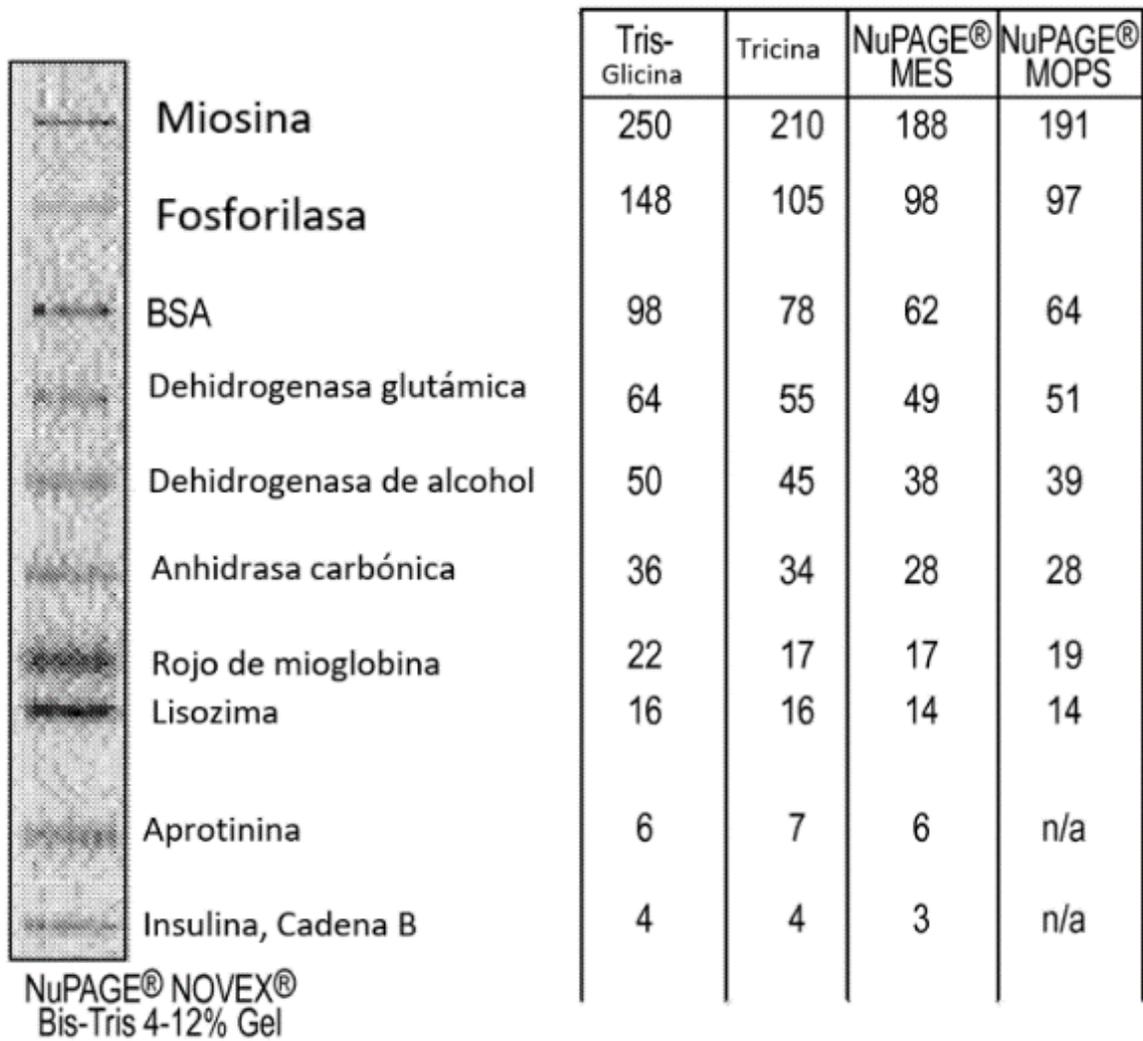
1      2      3      4      5



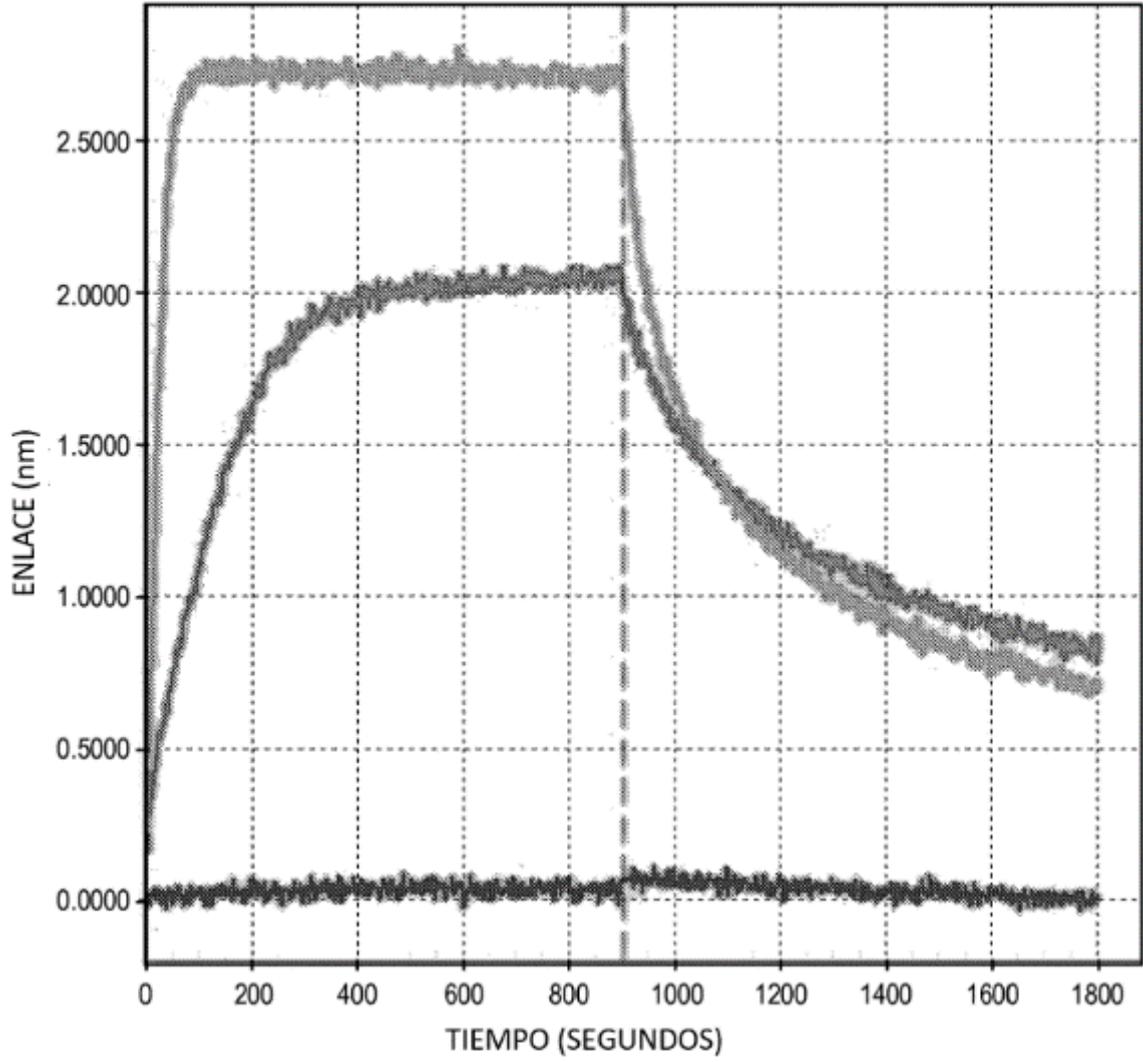
Carriles:

1. ESK1/OKT3 (2  $\mu$ g, Reducido)
2. 901/OKT3 (2  $\mu$ g, Reducido)
3. SeeBlue Plus Pre-Teñido Estándar
4. ESK1/OKT3 (2  $\mu$ g, No Reducido)
5. 901/OKT3 (2  $\mu$ g, No Reducido)

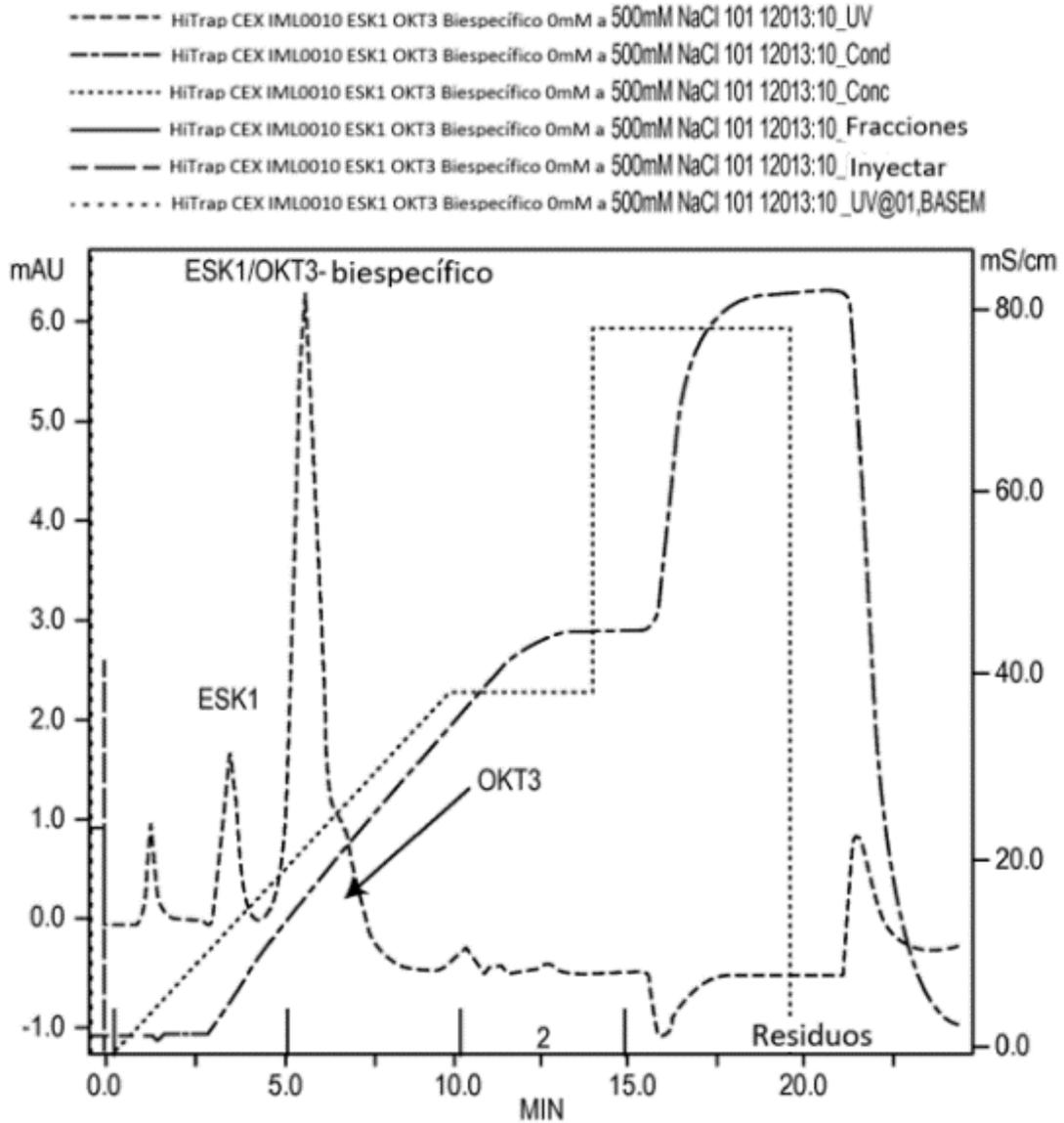
**FIGURA 11B**



**FIGURA 12**

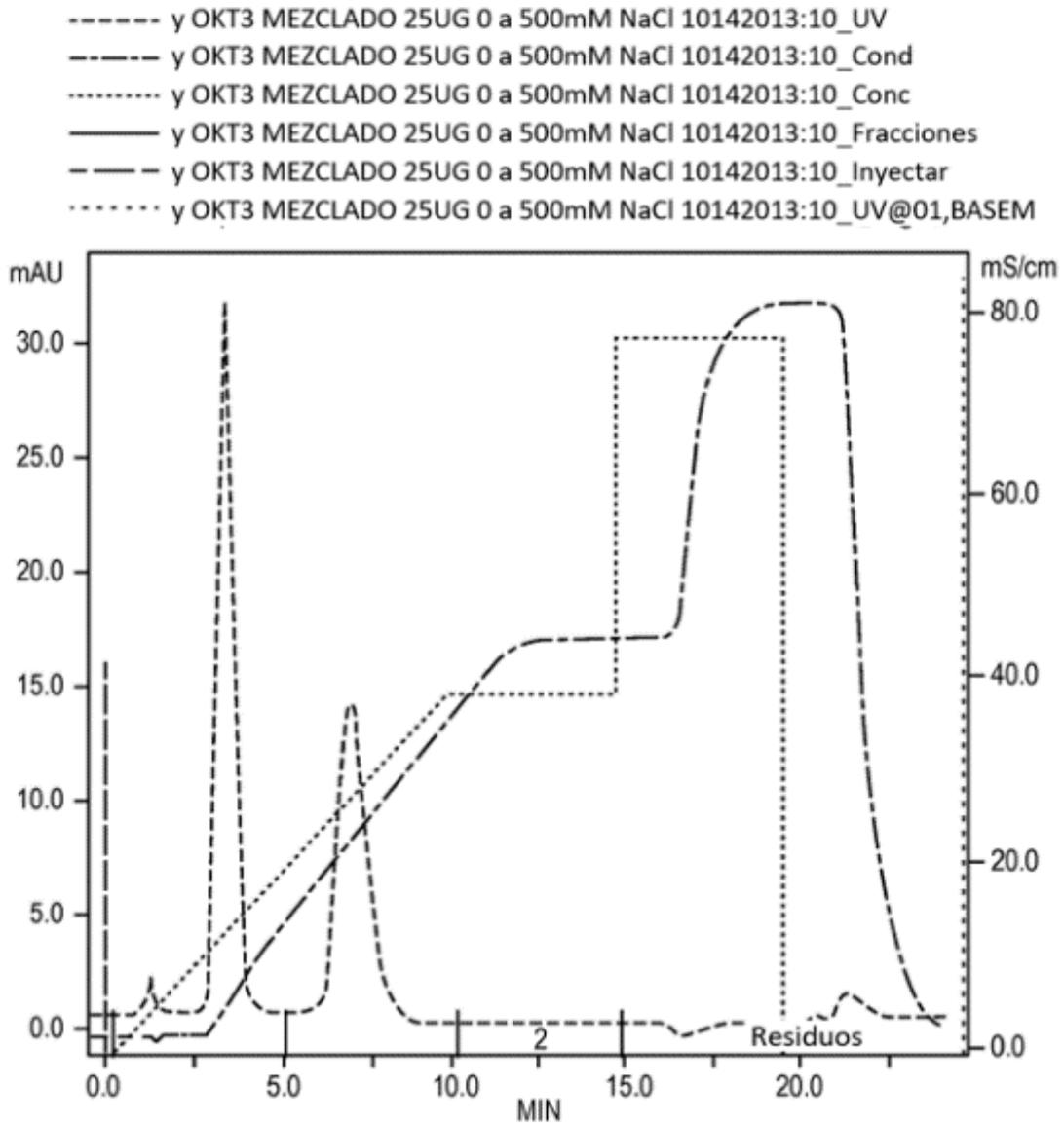


**FIGURA 13A**



	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA(m/AU)
ESK1	3.5	1.12	1.89
ESK1/OKT3	5.66	6.52	6.45

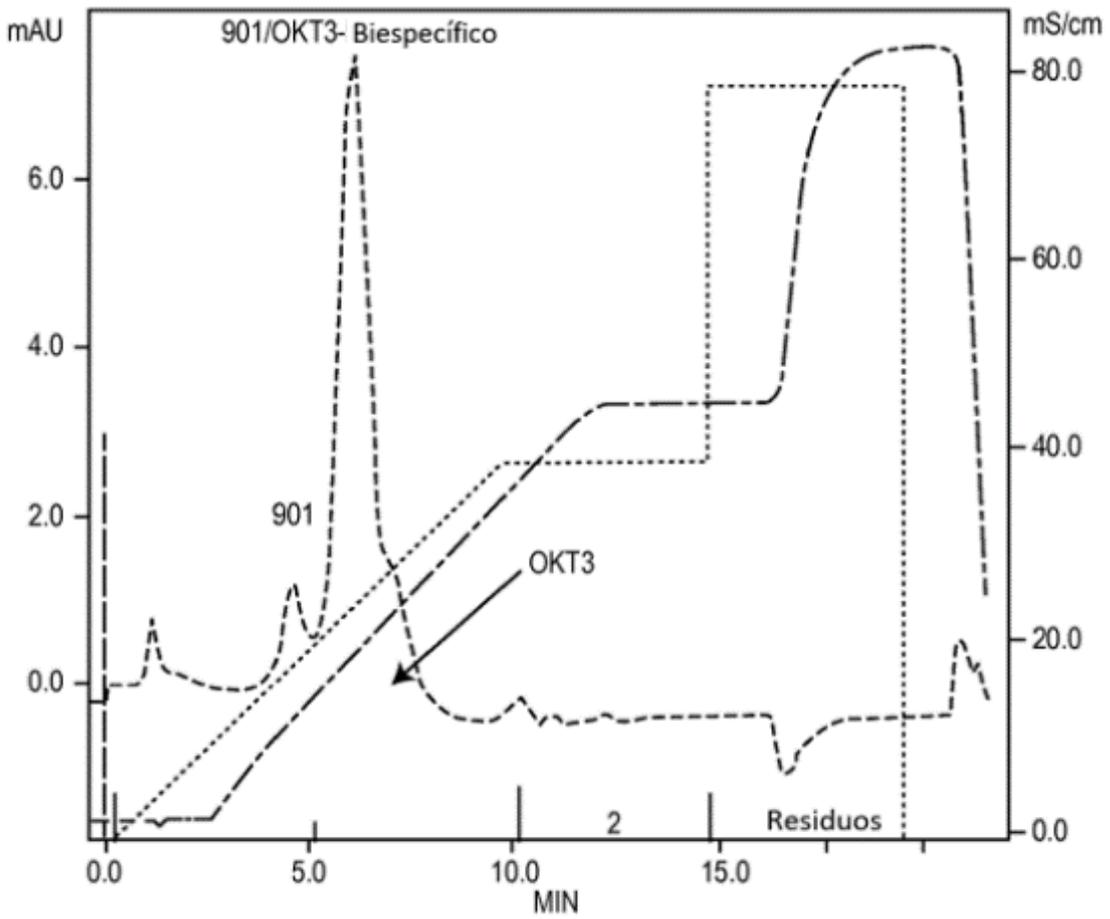
**FIGURA 13B**



	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA (m/AU)
ESK1	3.35	17.3	31.5
OKT3	7.04	13.8	13.9

**FIGURA 14A**

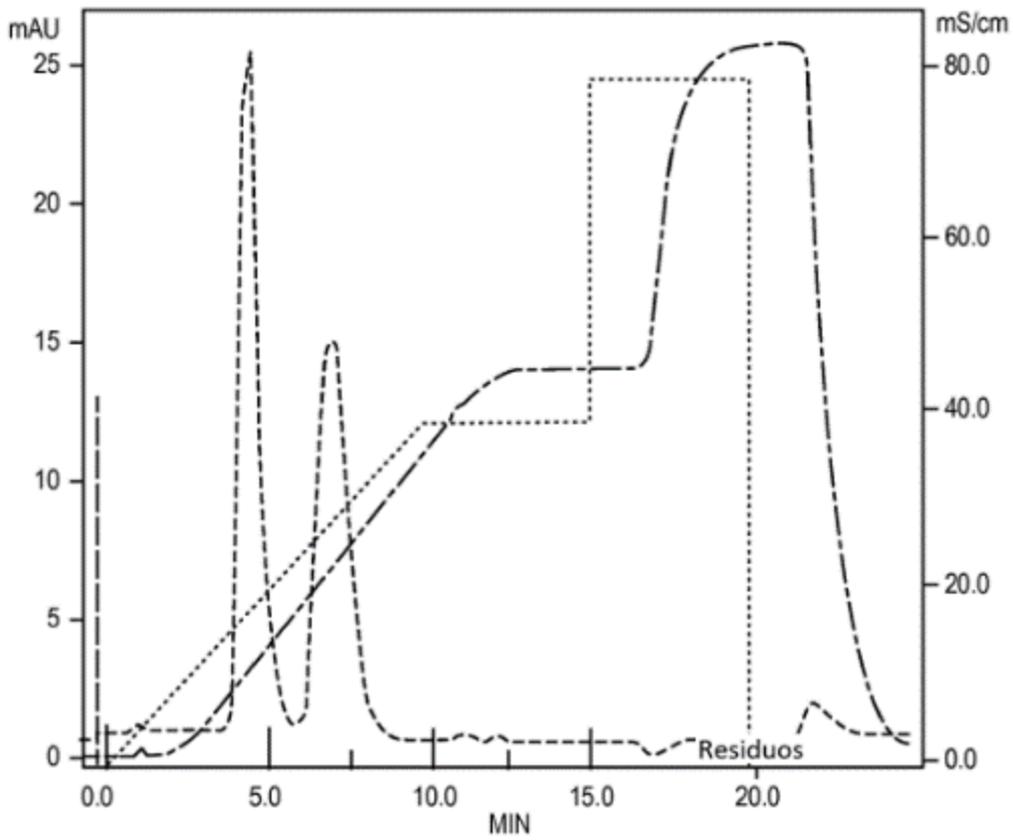
- Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_UV
- Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_Cond
- ..... Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_Conc
- Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_Fracciones
- Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_Inyectar
- ..... Biespecífico 0mM a 500 mM NaCl 101 12013:10\_UV@01,BASEM



	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA (mAU)
901	4.59	0.98	1.33
901/OKT3	6.01	7.87	7.73

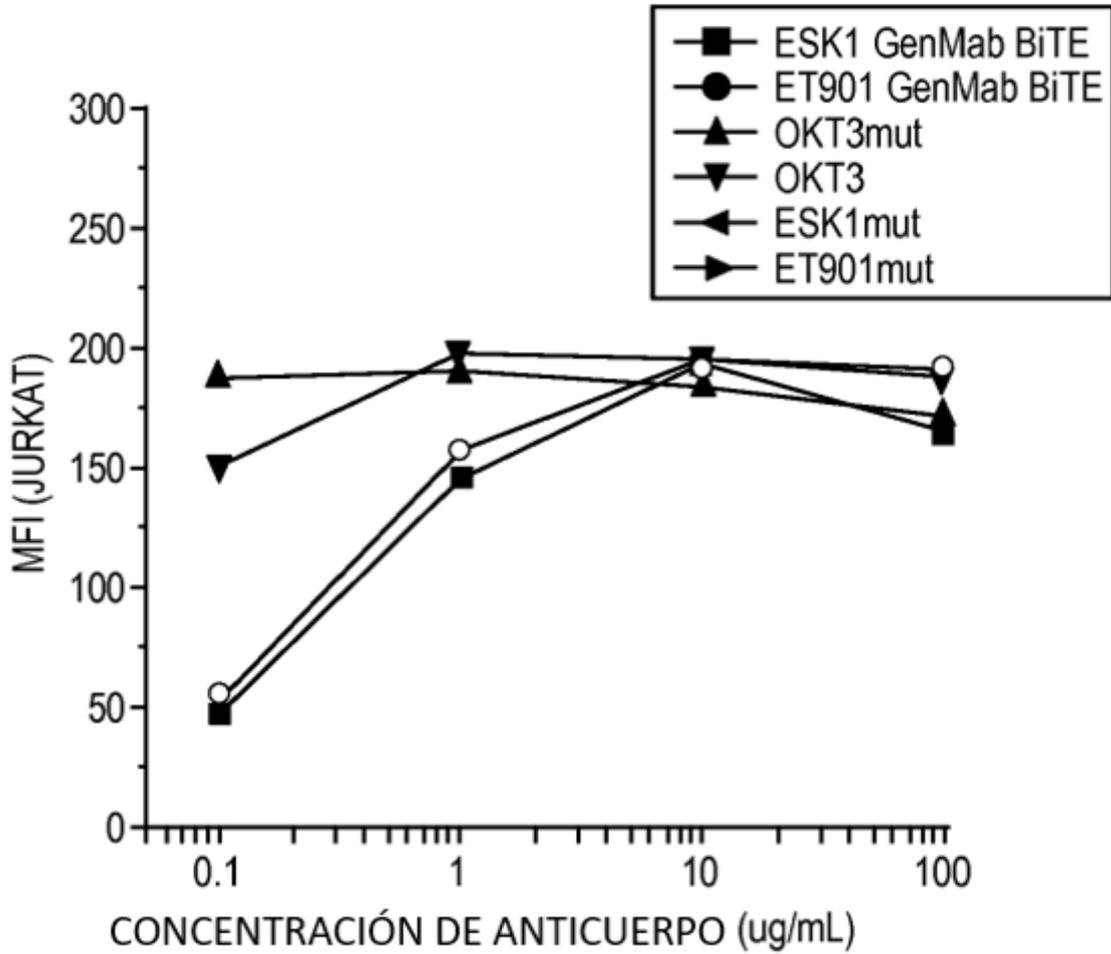
**FIGURA 14B**

- - - - - HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA UNO 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_UV  
 - - - - - HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_Cond  
 ······ HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_Conc  
 ——— HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_Fracciones  
 - - - - - HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_Inyectar  
 ······ HiTrap CEX 1ML013 901 y OKT3 MEZCLADO 25UG CADA 0 a 500 mM NaCl 10142013:10\_UV@01,BASEM

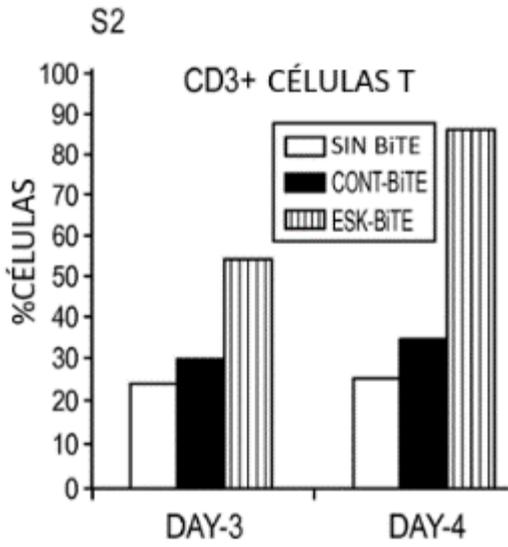


	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA (mAU)
901	4.59	16.9	26.5
OKT3	7.07	15.8	15.5

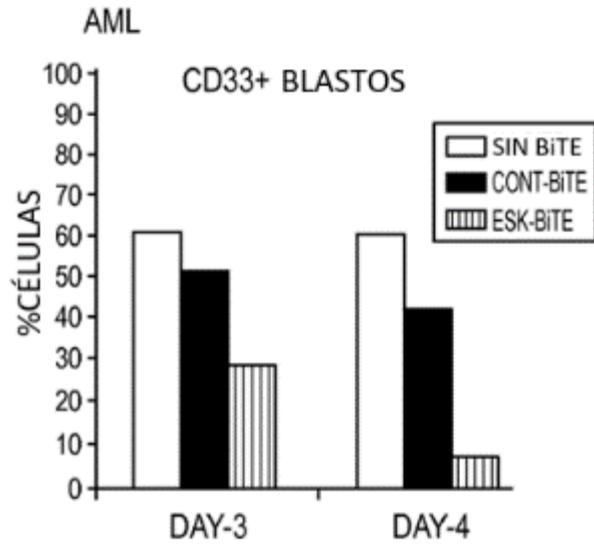
**FIGURA 15**



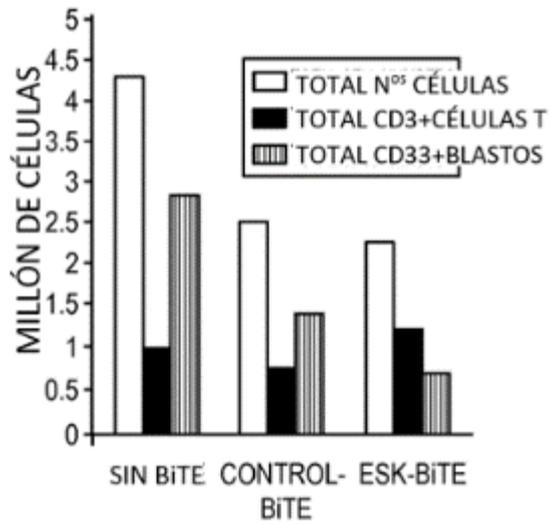
**FIGURA 16A**



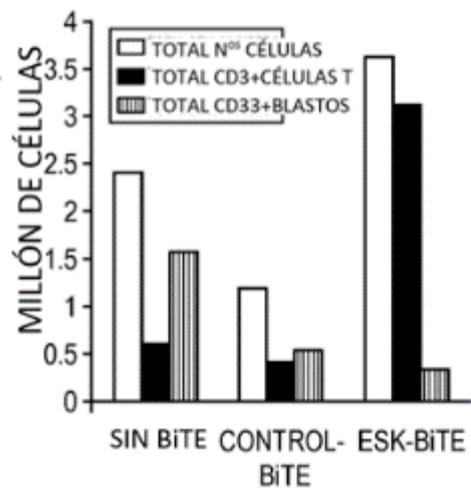
**FIGURA 16B**



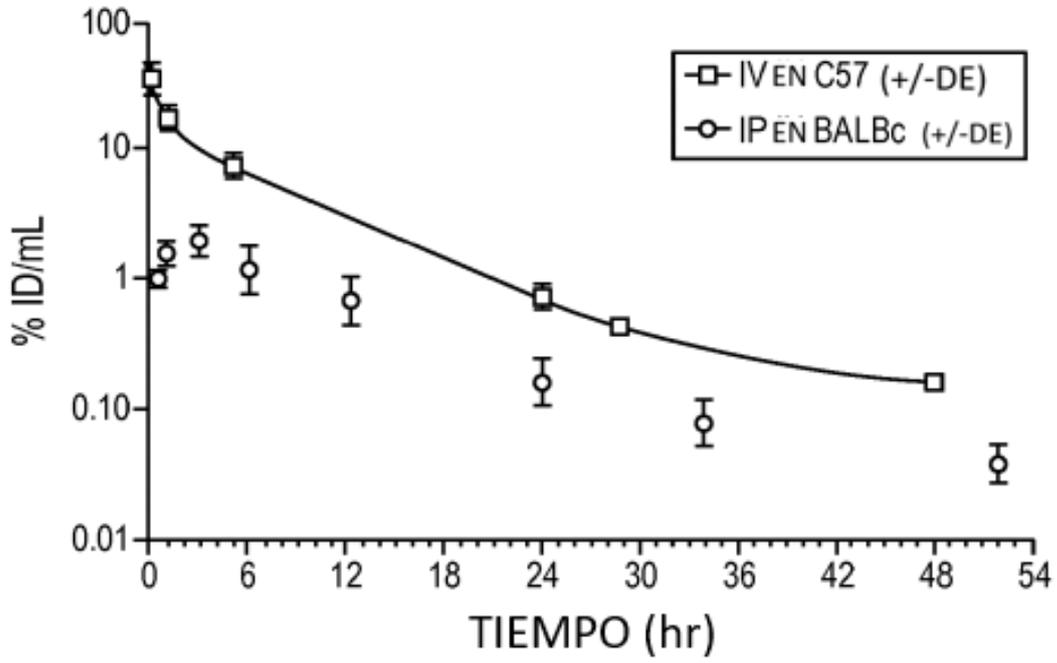
**FIGURA 16C**



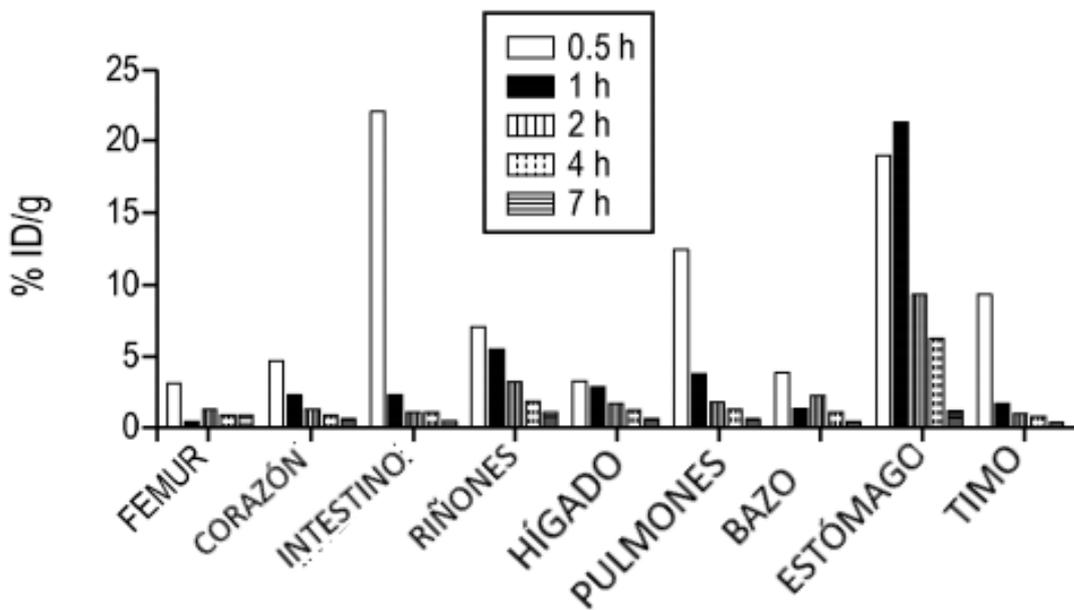
**FIGURA 16D**



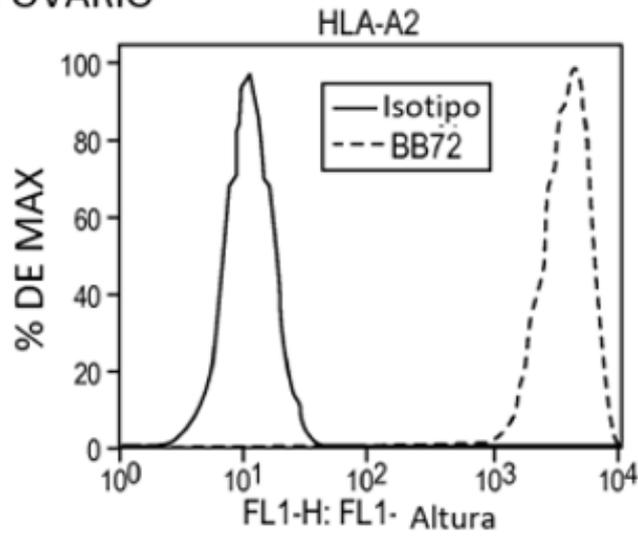
**FIGURA 17A**



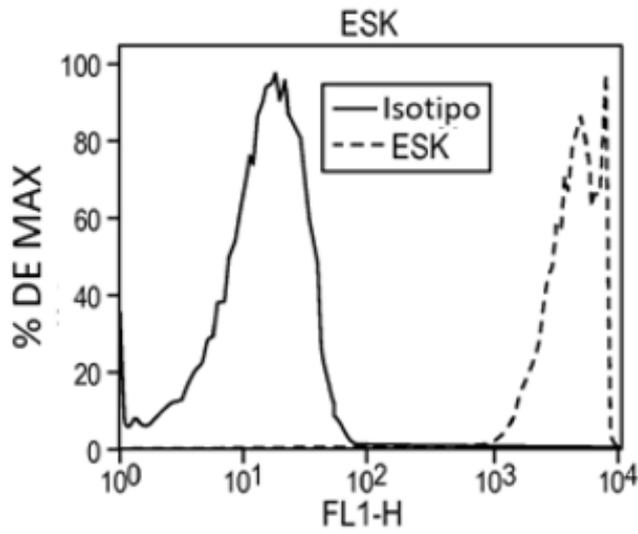
**FIGURA 17B**



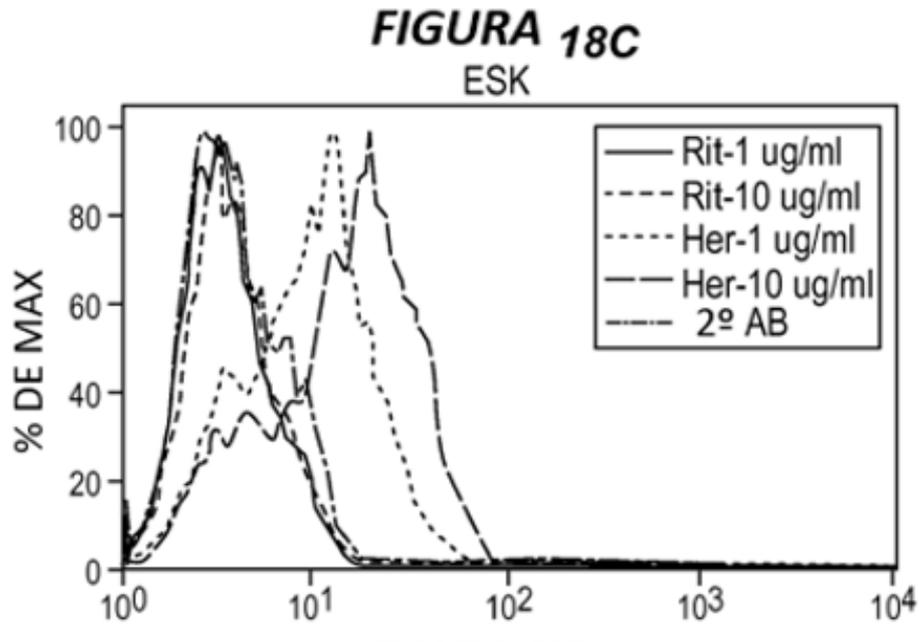
CÁNCER DE OVARIO



**FIGURA 18A**

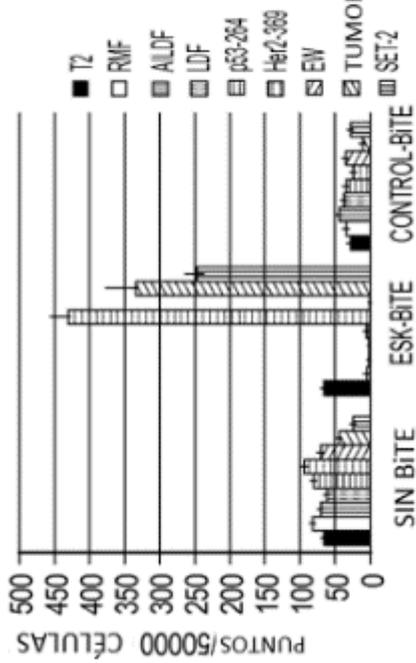


**FIGURA 18B**

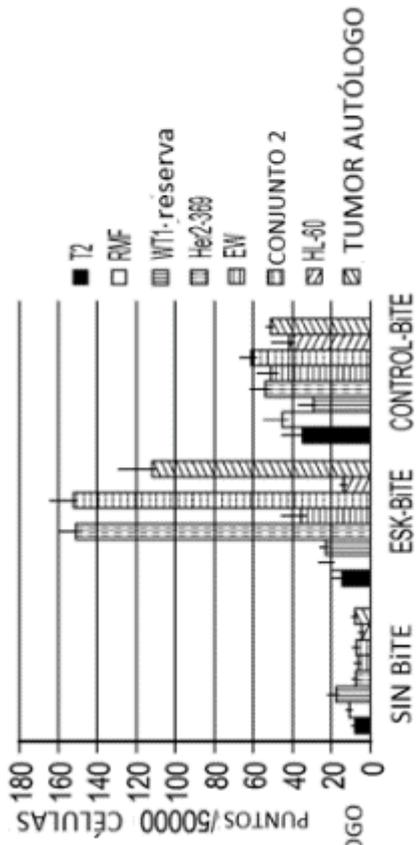


**FIGURA 18C**

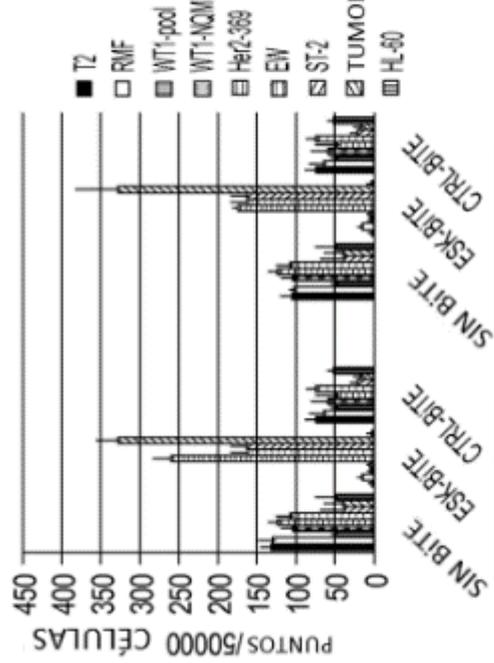
**FIGURA 19A**



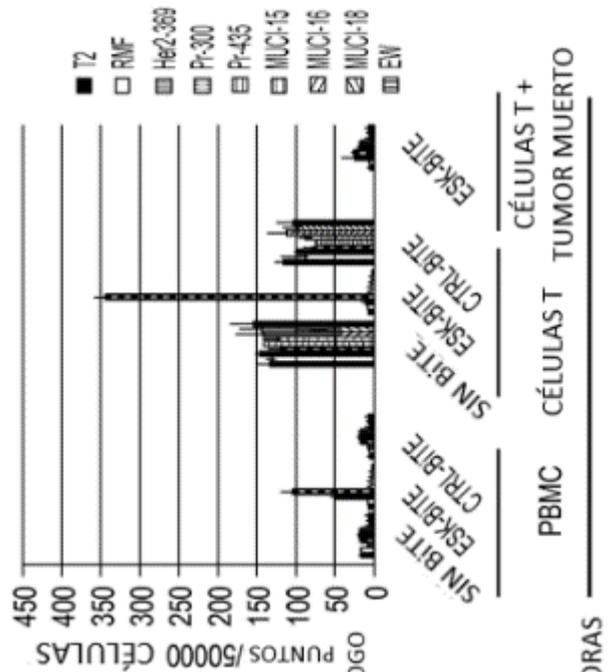
**FIGURA 19B**



**FIGURA 19C**

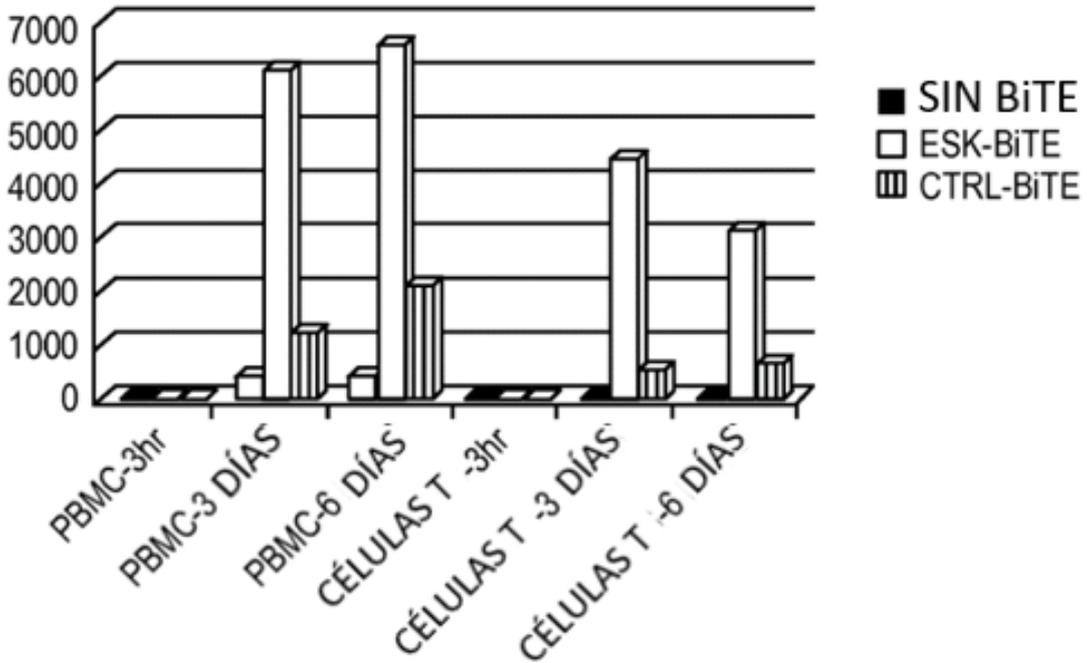


**FIGURA 19D**



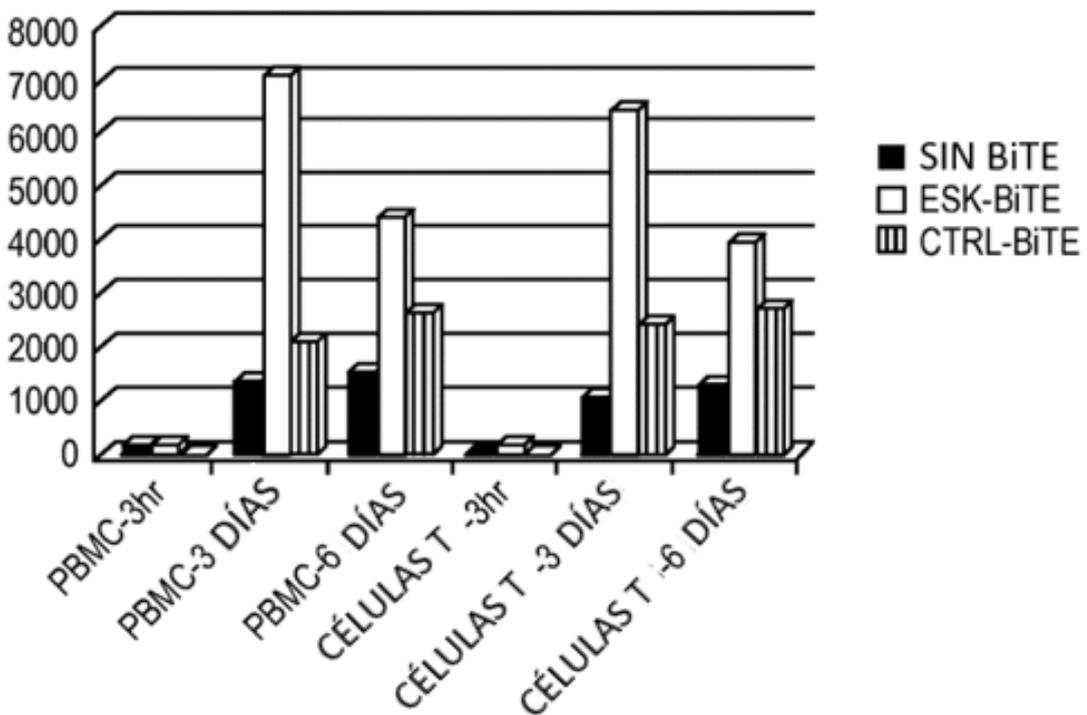
**FIGURA 19E**

LIBERACIÓN IFN-GAMMA



**FIGURA 19F**

LIBERACIÓN IFN-ALFA



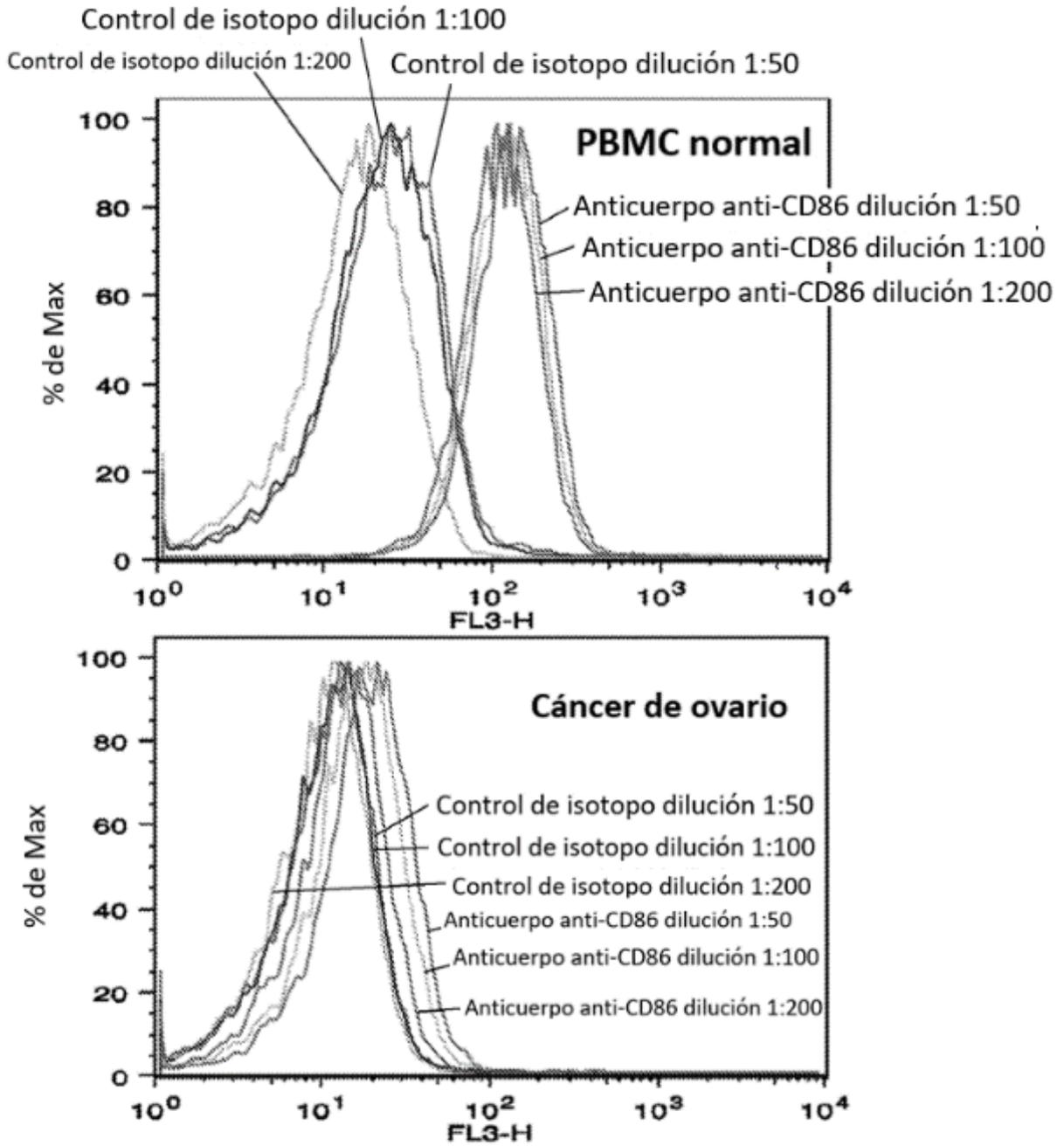


FIGURA 20

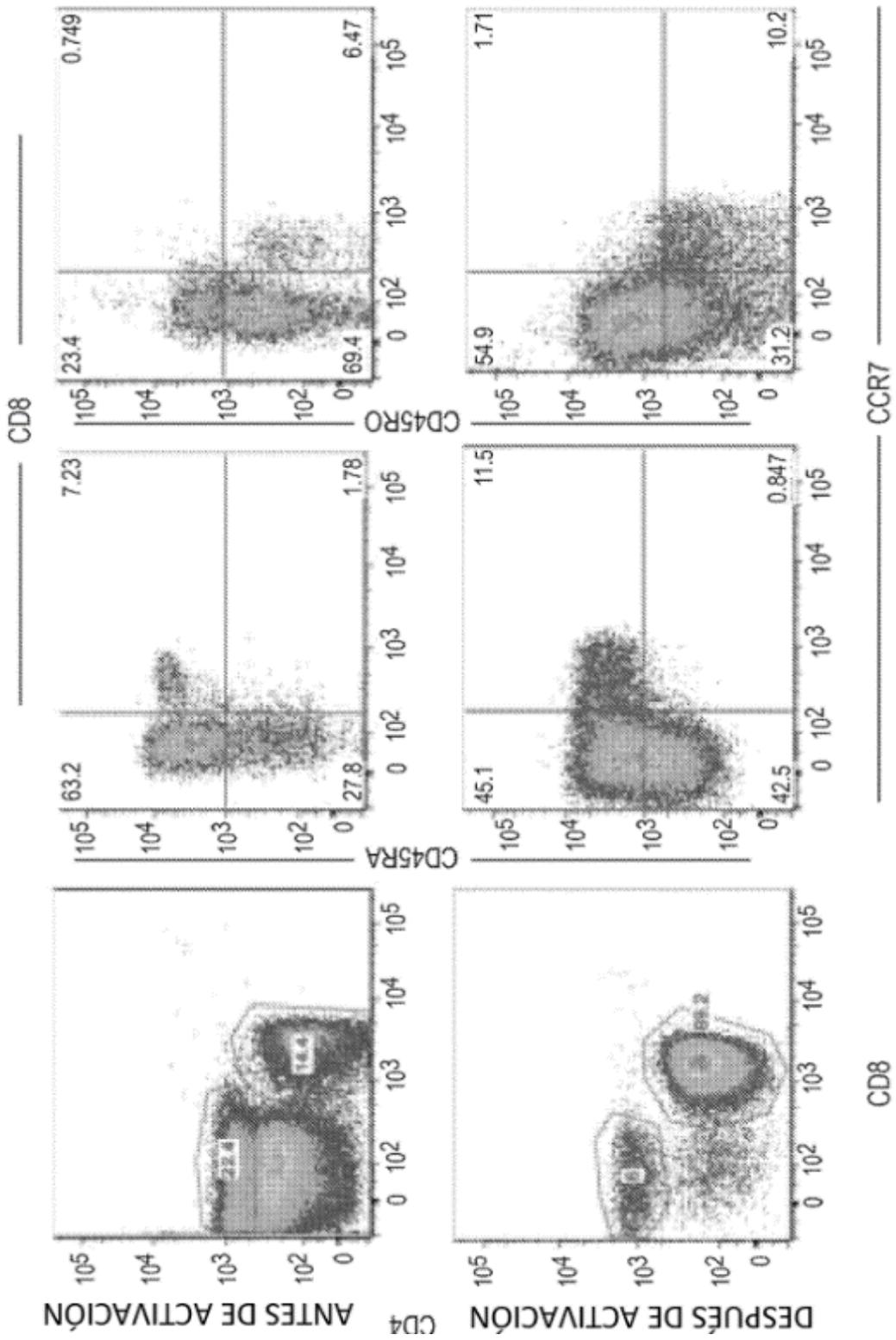
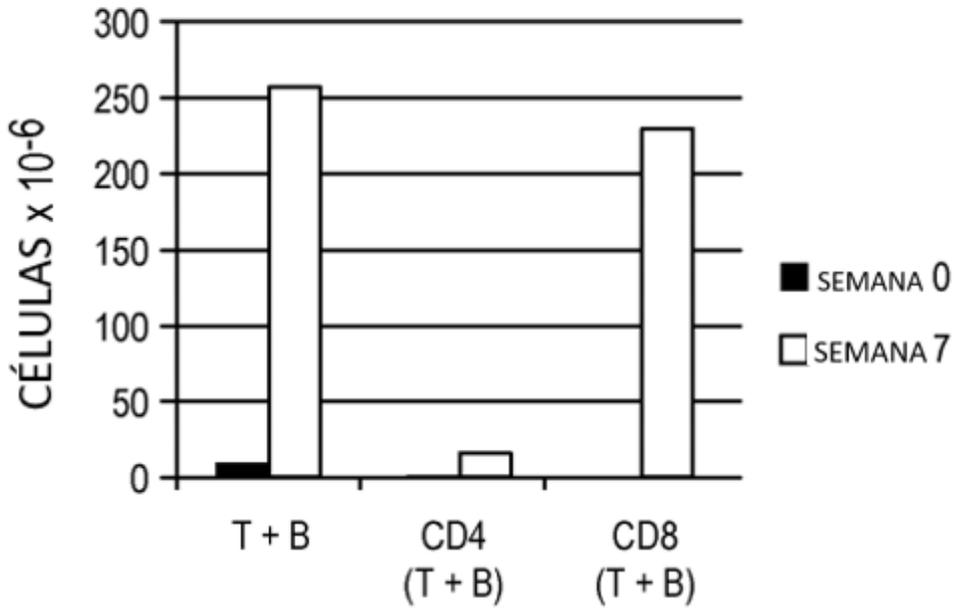


FIGURA 21A

**FIGURA 21B**



**FIGURA 21C**

