

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

**C07K 16/32** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (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 terapéuticos (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  
40 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  
50 (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 citotóxica 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  
60 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  
65 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).

**[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.

**[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

**[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:

(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

(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

(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;

(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;

(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;

(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;

(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

(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:

(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 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.

**[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+.

**[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.

#### 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 redirigir 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.

**[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 complejo 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.

**[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).

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

**[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.

**[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.

**[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.

**[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) 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, 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 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.

**[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 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.

**[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.

**[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-γ, 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-γ. El mismo protocolo de estimulación y el ensayo IFN-γ 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-γ (**19E**) y TNF-α (**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: Engendradora 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: Efectora: 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<sub>H</sub>: Cadena pesada variable incluye región hipervariable de cadena pesada y región marco variable de cadena pesada

V<sub>L</sub>: 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 VH) 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 VL) y una región CL constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL 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 VH y VL 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 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

(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



Tabla 1

Antígeno	WT1		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2)	GIIFGTANYAQKFG (SEQ ID NO: 3)	RIPPYGMDV (SEQ ID NO: 4)
ADN	ggaggcaccttcagcagcta tgctatcagc (SEQ ID NO: 5)	gggatacatccctatctttggtacagc aaactacgcacagaagttccaggc c (SEQ ID NO: 6)	cggattcccccggtactactacgggtatgg acgic (SEQ ID NO: 7)
VL	SGSSNIGSNVYV (SEQ ID NO: 8)	RSNQRPS (SEQ ID NO: 9)	AAWDDSLNGV (SEQ ID NO: 10)
ADN	tctggaagcagctccaacat cggaagtaattatgtatac (SEQ ID NO: 11)	aggaglaatcagoggccctca (SEQ ID NO: 12)	gcagcatggggtatgacagccctgaat gggtgtggta (SEQ ID NO: 13)
VH completo	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGHIIFGTANYAQKFGQRRVITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCA RRIPPYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 14)		
ADN	caggatgcagctggatgagctggtgaggaagccctgggtgctctggtgaggtctctgcaagccttct ggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgaggaagccctggacaaagggtctgagtggtggag ggatcatccctatctttgtacagcaaacctacgcacagaagttccagggtcagagtcacgattaccggagcgaat ccacggacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggaagcggcgtgtattactgtgcgagacg gattccccgtactacgggtatggagctgctggggcccaagggaaccaggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 15)		
VL completo	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYVYQQLPGTAPKLLIY RSNQRPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDDSLNGV VFGGGLKLTVLG (SEQ ID NO: 16)		
ADN	cagactgtgtgactcagccaccctcagctctgggacccccggggcagagggtcaccatctttgttggaaagc agctccaacatcggaaagtaattatgtatactgtgtaccacagctcccgaggaagggccccaaactctctatata ggagtaatacagcggccctcaggggtccctgaccgattctctgggtcccaagctgtgacacgtcctcctggcca tcagtgggccccgggtcgtggtgatgaggtgattactgtgacatgggtatgacagcctgaatgggtgtgtatt cggcgggaggaggaaccaagctgaccgtctctagggt (SEQ ID NO: 17)		







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)	VOYSGYYDWFDP (SEQ ID NO: 40)
ADN	ggatcacgcttcaccaactct ggatcagc (SEQ ID NO: 41)	aggggtgacccctggctactcttata gcacctacagcccgctctccaag gc (SEQ ID NO: 42)	gtacaatagtggtctactatgact gggtcgacccc (SEQ ID NO: 43)
VL	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 44)	SNNORPS (SEQ ID NO: 45)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 46)
ADN	tctggaagcagctccaacatc ggaagtaataactgtaaac (SEQ ID NO: 47)	aglaataatcagcgccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagccctgaa tggttggttg (SEQ ID NO: 49)
VH completo	QMLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEW MGRVDPGYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMY YCARVQYSGYYDWFDPWGGQTLVTSS (SEQ ID NO: 50)		
ADN	cagatgcagctgggtgcagtcgcgagcagagggtgaaagcccgggagctctgaggatctctgtaagggtt ctggatacagcttcaccaactctggtacagctgggtgcgcagatgccgggaaaggccctggagtgatggg gagggtgacccctgctactcttatagacacacccgctctccaagggccacgtcaccatctcagctgacaa gtctaccagcactgcctacacagtggaacagcctgaaggcctcgaagccgcatgtaactgtgctgagag tacaatatagtggctactatgactggttcgacccctggggccagggaaacccctggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 51)		
VL completo	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTNVNYYQQVPGTAPKLLI YSNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 52)		
ADN	caggctgtgggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccggggcagagggtcaccatctctgttctggaag cagctccaacatcgggaagtaatactgtaaaactgggtacacagcaggtcccaagggaacggcccccacatctct atagtaataatcagcgccctcagggggtccctgacggtctctgtgttcccaagctgacacacacacacacac ccatcagtggtgctcagtgatgaggtgctgattactgtgacagcatgggtgacagccctgaatgggtggg tggtcggcgagggaaccagctgaccgtctctaggt (SEQ ID NO: 53)		





**Tabla 4**

Antígeno	WT1 (Ext002 #15)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GYNFSNKGWIG (SEQ ID NO: 56)	IYPGYSDITYSPSFQ (SEQ ID NO: 57)	HTALAGFDY (SEQ ID NO: 58)
ADN	ggctacaactttagcaacaagt ggatcggc (SEQ ID NO: 59)	atcatctatccccgggtactcggacat cacctacagcccgctcctccaaggc (SEQ ID NO: 60)	cacacagctttggccggctttgact ac (SEQ ID NO: 61)
VL	RASQINIKWLA (SEQ ID NO: 62)	KASSLES (SEQ ID NO: 63)	QQYNSYAT (SEQ ID NO: 64)
ADN	Cgggccagtcagaatatcaat aagtggctggcc (SEQ ID NO: 65)	aaggcgtctagttiaaaaagt (SEQ ID NO: 66)	caacaataataatagttatggaacg (SEQ ID NO: 67)
VH completo	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISKKGSGYNFSNKWIGWVRQLPGRGLEWI AIIYPGYSDITYSPSFQGRVTISADTSINTAYLHWHSLKASDTAMYCYVR HTALAGFDYWGLGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
ADN	caggtgcagctgggtgcagctctggagcagagtgtaaaaaagcccgagagctctgaagatctcctgtaagggttct ggctacaactttagcaacaagtggatcggctgggtgcgccaattgcccgaggagcctggagtgatagcaat catctatccgggttactcggacatcacctacagcccgctcctccaaggccgctaccatcctccggcagacagctcc attaacacggccttactgcactggcacagcctgaaggccctcgacaccccatgtattgtgtgctgacacaca gccttggccggcttgactactggggcctggccacccctggctaccgctcctca (SEQ ID NO: 69)		
VL completo	DIQMTQSPSTLSASVGDVRVITTCRASQINIKWLA WYQQRPGKAPQLLIY KASSLESGVPSRFSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYCYCQQYNSYATFGQ GTKVEIKR (SEQ ID NO: 70)		
ADN	gacatccagatgaccagctctcctccaccctgtctgcatctgtagagacagagtcacaatcacttgcggggcca gtcagaataatacaataagtggtggctggctggtatcagacagagggaaagccccctcctgctatataagg cgtctagttagaaaagtggtgggtcccatctaggttcagcggcagtgatctgggacagaatacactctcaccatcag cagcctgcagcctgatgtatttgcaacttacttgcacaaataataatagttatgcgacgttcggccaaaggggacca aggtggaaatacaacgt (SEQ ID NO: 71)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ext002 #15)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVTITCRASQINIKWLAWYQQRPGKAPQLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDEFATYYCQQYNSYATFGQ GTKVEIKRSRGGSGSGSGGGGSGLEMAQVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYNFNSNKWIGWVRQLPGRGLEWIAIIPGYSDITYSPSFQGR VTISADTSINTAYLHWHSCLKASDTAMYCYCVRHTALAGFDYWGLGLTLV TVSS (SEQ ID NO: 72)		
ADN	gacatccagatgacccagtcctcttcacccctgtctgcatctgttaggagacagagtcacaatcaccttgcggggcca gtcagaataatcaataaagtgctggcctgggtatcagcagagaccaggggaaagccctcagctcctgcatctataaagg cgtctagttagaaagtggggtcccatctagttcagcggcagtgatctgggacagaatactcaccatcag cagcctgcagcctgatgatttgcacatttactgccaacaataataatattatgcgacgttcggccaaggggacca agtggtgaaatcaaacgttctagaggtgggtgggttagcggcggcggcctctctgggtgggtgggtatccctcg <b>agatggcc</b> caggtgcagctggtgcagtctggagcagagtgaaaaagcccggagagtcctctgaaagatctctgt aaggggtctgtgtacaaacttttagcaacaagtggtatcgtctgggtgctgccaattggcccggggagagggcctggagtg gtagcaatcatctatccgggttactcggacatcacctacagcccgtctcttccaagggccgctcaccatctccggcc gacaggtccatttaacacggcctacctgcactgggcacacagcctgaagggcctgggacacggcccatgtatttgggtgc gacacacagcttggcggcgtttgactactggtggcctgggcacccctgggtcacccgtctctca (SEQ ID NO: 73)		



**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	gggttcaccttggatgattatgg catgagc (SEQ ID NO: 77)	gggtattaatggatgggtgtagc acaggttatgcagactctgtgag gggc (SEQ ID NO: 78)	gagcgtggctacgggtaccatga tcccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QVWDSSSDHV (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 ALYYCARERGYGYHDPHDYWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 86)		
ADN	gaagtgcagctgggtcagctctgggggaggtgtggtacggcctgggggtccctgagactctctgtgcagc ctctgggttcaccttggatgattatggcatgagctgggtccgccaagctccagggaaggggctggagtgggtc tctgggtattaatggatgggtgtagcacaggttatgcagactctgtgaggggcccgaftcaccatctccagaga caacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcg agagagcgtggctacgggtaccatgatcccatgactactggggccaaggcaccctgggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 87)		
VL completo	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFGGGKLTVLG (SEQ ID NO: 88)		
ADN	cagctctgtctgacgcagcgcgcctcgggtcagtggtcccgaggaaagacggccaggattacgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgactgtgtaccagcagaagccaggccaggccctgtgtgtgtgtct tgatgatagcgaccggcctcagggtacccctgagcgattctgtgtcctaactctgggaacacggccaccct gaccatcagcaggggtcgaagccgggatgagggcgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtga tgtgtattcggcgaggggaccaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 89)		
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFGGGKLTVLG <b>SRGGGGSGGGGSGGSLEMA</b> EVQLVQSGG GVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINW NGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARER GYGYHDPHDYWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 90)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ext002 #18)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
ADN	cagtctgtcgtgacgcagccgcctcgggtgtcagtggccccaggaagacggccaggattacctgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcgtcta tgatgatagcgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccacct gaccatcagcagggtcgaagccggggatgagggccgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtcat tgtggtattcggcggaggggaccaagctgaccgtcctaggttctagaggtgggtggtagcggcggcggc <b>ggctctgggtggatccctcgagatggcgaagtgcagctggtgcagctctgggggaggtgtgttacggcctg</b> gggggtccctgagactctctgtgcagcctctgggttcacctttgatgattatggcatgagctgggtccgcaa gctccagggaaggggctggagtggtctctgttattaattggaatgggtgtagcacaggttatgcagactctg tgaggggcccattcaccatctccagagacaacccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctgagag ccgaggacacggccttgattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatccccatgactactggg gccaaggcacctgtgtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 91)		

**Tabla 6**

Antígeno	WT1 (Ext002 #23)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GFSVSGTYMG (SEQ ID NO. 92)	LLYSGGGTYHPASLQG (SEQ ID NO. 93)	GGAGGGHFD (SEQ ID NO. 94)
ADN	gggttcctcgtcagtgccact acatgggc(SEQ ID NO. 95)	cttctttagtggtggggcacata ccaccagcgtccctgcagggc (SEQ ID NO. 96)	gagggcagagtggtggccactt tgactcc (SEQ ID NO. 97)
VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO. 98)	GNSNRPS (SEQ ID NO. 99)	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO. 100)
ADN	actgggagcagctccaacac ggggcaggttatgatgacac (SEQ ID NO. 101)	gglaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO. 102)	gcagcatgggatgacagcctga atggttatgc (SEQ ID NO. 103)
VH completo	EVQLVETGGLLQPGGSLRLSCAASGFSVSGTYMGVVRQAPGKGLEW VALLYSGGGTYHPASLQGRFIVSRDSSKNMVLQMNSLKAEDTAVYY CAKGGAGGGHFDWSWGQTLVTVSS (SEQ ID NO. 104)		
ADN	gaggtgcagctggtggagaccggaggcgtgtctccagccgggggggtccctcagactctctgtgcagcct ctgggtctcgtcagtgccactacatgggtgggtcgcagagctccagggagggagctggagtggtgca cttctttagtggtggcgacacacaccagcgtccctcagggcggttcctcagagagacagctcca agaatatggtctatcttcaaatgaatagcctgaagccgagagacggcgctctattactgtgcgaaaggagggg caggagggtggccacttgactctgggggccaaggcaccctgggtgaccgtctctca (SEQ ID NO. 105)		
VL completo	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI YGNSNRPSGVPDFSGSKSGTSASLISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GYVFGTGTKLTVLG (SEQ ID NO. 106)		
ADN	cagctgtgttgacgcagcccgccctcagtgctggggggggcagggcagaggtcaccatctctgcactggggag cagctccaacatcgggcgaggttatgatgtacatgggtaccagcagcttcaggaaacagcccccaactctcat ctatggttaacagaatcgccctcaggggtccctgacggatctctggtctcaggtctgacacacagcctcctg ggccatcagtggtccagctgaggtgaggtgattactgtgacgcatgggatgacagcctgaatgggttatgt cttcggaactgggaccagctgaccgtctaggt (SEQ ID NO. 107)		

(continúa)

Antígeno	WT1 (Ext002 #23)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRs:	1	2	3
scFv	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI YGNSNRPSGVPDFSGSKSGTASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GYVFG TGTKLTVLGSRRGGGGGGGGGGGSGLEMAEVQLVETGGGLQPGG SLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPASL QGRFIVSRDSSKNMYYLQMNLSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDSWG QGTLTVTVSS (SEQ ID NO. 108)		
ADN	cagtcgtgttgacgcagccgcctcagtgctgtggggcccccagggcagagggtcacccatctctgcactggggag cagctccaaacatcggggcaggttatgatactggtgtaaccagcagcttcacaggaacagcccccaactctcat ctatgtaacagcaatcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaaagctgacacctcagccctccctg gccatcagtggtgctcagctcagggatgagctgattattactgtgcagcatgggatgacagccctgaatggttatgt ctctggaaactggggaccagctgaccgctcctaggttctagagggtggtgtagcggcggcggcctctgggt gggtggggtatccctcgagatggccgggtgcagctggtggagaccggagggaggtctgtccagccggggggg gtccctcagactctctgtgcagccctctgggtctcctcagtggtgacacacacaggggtgggtccaggtctcca gggaaggagactgtgagtggtgcactcttattatagtggtggcgcacataccacccagcgtccctgcagggccg attcatgctccagagacagctcccaagaatatggtctatcttcaaatgaatagctgaagccggagacacggcc gtctattactgtcgaaaggaggggcaggaggtggccacttgactctctggggcccaaggcaccctgtgtgaccgt ctctctca (SEQ ID NO. 109)		



**Tabla 7**

Antígeno	CD3/L2K
VL completo	DDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWI YDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 111)
VH completo	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 112)
scFv	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSS <b>GEGTSTGSGGSGGSGG</b> ADDIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSK VASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 113)
ADN sin Secuencia de señal y etiqueta his	caggctgtcgtgactcagcctcctctgcttctggcaccctggccagagagtaccatctcctgctccggctcctc ctccaacatcggtcccaacaccgtgaactggatcagcagggtgccggcaccgcccccaagctgctgatctactc taacaaccagcgccctcggcgtgcccgcagattctctggctctaagtcggcacctccgctcctcctggctat ctctggcctgcagctgaggacgagggcgactactactgcgcgcctgggacgattctctgaacggctgggtgtt cggcggaggcaccagctgacagtgtctgggaagtagaggcggggtggcgaatctggcgaggatctggcg gagggggctctctgaaatggccagatgcagctgggtcagctctggcgcgaagtgaagagcctggcgagtc cctgcggatctcctgcaagggctcggctacagctttaccaactctggatcagctgggtgcgacagatgccgg caagggcctggaatggatgggcagagtggacccggctactcctactccactactccccagcttccaggggc acgtgaccatcagcgccgacaagtctacctccaccgctactgcagtgaactccctgaaggcctccgacacc gcatgtactactgtgcccgggtgcagtacagcggtactacgattgggtcgaccctggggccaggggcaccctc gtgacagtgtctagtgccgggggaggatccgacgtgcagctgggtgcagagcggagctgaagtgaagaaactg gcgcctcctgaagggtgtcctgcaaagctagcggctataccttaccgggtacaccatgcactgggtgcgcag gcacctggacagggactggaatggatcggctacatcaacccctccggggctacaccaactacgcccactctgt gaagggccggttcaccatcaccaccgataagtcaccagcaccgcttacctgaactgtctcctgagatccga ggacaccgctacctactattgcgccgggtactacgacgacctactgctggactactggggacaggggaacca cagtgaccgtgtctctggcgagggcacctctactggatctgggggaagtgtgtgtctggcggcgtgacgac atcgtgtgacccagctctcagccaccctgtctctgagccaggcgagagagctaccctgtcctgcagagcctcc cagtcctgtctcatgaattggatcagcagaagcctggcaaggccctaagcggtggtgatctacgacacctcc aaggtggcctctggcgtgcagcccggttttcggatctggtctggcaccgactactcctgacctcaacagc ctggaagcagagacgtgccacctattactgccagcagtggtctccaacccctgaccttggaggcgccac caaggtggaaatcaag (SEQ ID NO: 114)

(continúa)

Antígeno	CD3/L2K
ADN con secuencia de señal y etiqueta de hexahistidina	atgggctggctcctgcatcactctgtttctgggtggctaccgccaccggccaggtgtcgtgactcagcctctctctgct tctggcacccctggccagagagtgaccatctctctgctcggctcctcctccaacatcggctccaacaccgtgaact ggtatcagcaggtgcccgccaccgcccccaagctgctgactctcttaacaaccagcggccctcggcgctgccc gacagattctctggctctaagtcggccacctcggcctccctggctatctctggcctgagctctgaggacgagggccg actactactgcgcgcctgggacgattctctgaacggctgggtgttcggcgaggacaccaagctgacagtgctg ggaagtagaggcggtggcgatctgggtggcgaggatctggcgagggggctcttggaatggccagatg cagctgggtgagctctggcgccgaagtgaagagcctggcgagtcctgcggtatcctgcaagggtcgggcta cagctttaccaactctggatcagctgggtgagacagatgccggcaaggcgctggaatggatgggagagtggtg accccggtactcctactccactactccccagcttcaggggccacgtgacctcagcgcgacaagtctacct ccaccgctactcagtggaactcctgaaggcctccgacaccgccatgtactactgtgccccgggtgagtgaca gctgctactacgattggtgacccctggggccaggggcacctcgtgacagtgcttagtggcggggagggatcc gacgtgagctggtgagagcggtgctgaagtgaagaaacctggcgctcctggaaggtgctctgcaaagcta gggtgtataccttcacccgggtacaccatgactgggtgagcagggcacctggacagggactggaatggatcgg ctacatcaacccctcgggggtacaccaactacgcgactctgtgaaggcggttcaccatcaccaccgataa gtccaccagcaccgcttacatggaactgtcctcctgagatccaggacaccgctactactattgcgccgggtac tacgacgaccactactgctggactactggggacagggaaccacagtgaccgtgctctgaggggacacctc tactggatctgggggaagtgggtgtctggcgcgctgacgacatcgtgctgacctcagctccagccacctgtct ctgagcccaggcgagagagctaccctgtctgagagcctccagtcgtgctctacatgaattggtatcagcag aagcctggcaaggcccctaagcggtggatctacgacacctccaaggtggcctctggtgctgagcccggttttc cggtatctggtctggcaccgactactcctgaccatcaacagcctggaagccgaggacgtgccaacctattactg ccagcagtggtcctccaacccctgacctttggaggcgccaccaaggtggaatcaagcaccaccatcatcacc 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)	VQSYGYDWFDP (SEQ ID NO: 118)
ADN	ggatacagcttcaccaactct ggatcagc (SEQ ID NO: 119)	agggttgatcctggctactcttatagc acctacagcccgctctccaaggc (SEQ ID NO: 120)	gtacaataatagtggtactatgact ggctcgacccc (SEQ ID NO: 121)
VL	SGSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 122)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 123)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 124)
ADN	tctggaagcagctccaacatc ggaagtaatactgtaaac (SEQ ID NO: 125)	agtaataatcagcgccctca (SEQ ID NO: 126)	gcagcatgggatgacagccctga atggttggtg (SEQ ID NO: 127)
HC completo	QMQLVQSGAEVKEPGEISCKSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEW MGRVDPGYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMY CARVQYSGYYDWFDPWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 128)		



(continúa)

[illegible]



(continúa)

Antígeno	WT1		
	1	2	3
CDRs:			
ADN	CAGGCTGTCGTGACTCAGCCTCCTTCTGCTTCTGGCACCCCTGGCCA GAGGTGACCACTCTCTGCTCCGGCTCCTCCTCCAACATCGGCTCCA ACACCGTGAACCTGGTATCAGCAGGTGCCCGGCACCGCCCCCAAGCT GCTGATCTACTTAACAACAGCGGCCCTCCGGCGTGCCCGACAGAT TCTCTGGCTCTAAGTCCGGCACCTCCGCCCTCCCTGGCTATCTCTGGCC TGCAGTCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGCCGCTGGGACGA TTCTCTGAACGGCTGGGTGTTCCGGCGAGGCACCAAGCTGACAGTGC TGGGCCAGCCTAAGGCCAACCCCTACCGTGACCCCTGTTCCCCCATCC TCCGAGGAACCTGCAGGCTAACAAAGGCCACCCCTCGTGTGCTGATCTC CGACTTCTACCTGGCGCGTGACCGTGCCCTGGAAGGCTGATGGAT CTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAACCAACCAAGCCCTCCAAAGCAGTC CAACAACAAATACGCCGCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCTGAGC AGTGGAAGTCCCACCGTCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGG CTCCACCGTGGAAGAACCGGTGGCTCCTACCGAGTGCTCCTAG (SEQ ID NO: 131)		
scFv	QAVVTQPPSASGTPGQRTVISCSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPKLLIY SNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCAAWDDSLNG WVFGGGTKLTVLG <b>SRGGGGSGGGSGGGGLEMA</b> QMQLVQSGAEV KEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYST YSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKAASDTAMYCARVQYSGGYD WFDPPWQGGLVTVSS (SEQ ID NO: 132)		

(continúa)

[illegible]

**Tabla 9**

Antígeno	OKT3
HC completo	<p>QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE  WIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAF LQMDSL RPEDTG VYF  CARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGK*  (SEQ ID NO: 134)</p>
ADN	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGGGCGGCGTGGTGCAGCCCCGCC  GGTCCCTGCGGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCCGG  TACACCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGGAAGGGCCTGGAGT  GGATCGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCA  GAAGTTCAAGGACCGGTTACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAAC  ACCGCCTTCTGCGAGATGGACTCCCTGCGGCGGAGGACACCGGCGT  GTACTTCTGCGCCCGGTACTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACT  GGGGCCAGGGCACCCCGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGG  CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG  GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG  GTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA  CCTTCCCGGCGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG  CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT  GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACG  ACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC  CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG  GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGA  GGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCC  TGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC  CAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC  AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC  GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG  CAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG  ACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG  TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT  GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT  GA  (SEQ ID NO: 135)</p>

(continúa)

Antígeno	OKT3
LC completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQ GTLKQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQLSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 136)
ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGG CGACCGGGTGACCATCACCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGTCTACA TGAAGTGGTACCAGCAGACCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCGGTGGAT CTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGGTTCTCCG GCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCTTACCATCTCCTCCCTGCAG CCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCC CTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCCGGACCGTGG CCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAG TCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGC AACTCCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCT ACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCTCCCC CGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG (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 procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas 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 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 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: 116; una VH CDR2 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.

**[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.

**[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.

**[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 inmunoestimulante, 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.

**[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.

**[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.

**[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 mielodisplásico (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
- 10 consiste en cáncer suprarrenal, carcinoma de células acínicas, neuroma acústico, melanoma lentiginoso acral, 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 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,
- 15 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 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 disembrionario, disgerminoma, carcinoma embrionario, neoplasma de la glándula endocrina, tumor del seno 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
- 25 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 hepatosplénico 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 maligno de la vaina del nervio periférico, tumor maligno del tritón, linfoma de células del manto, linfoma de células
- 30 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, 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 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 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,
- 40 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 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, 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,
- 65

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 CD3ε 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 CD3ε 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 µg/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 µg/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 µg/ml de cada anticuerpo dentro de 0,5 ml. Se añadieron 12,5 µl 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 µl, 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-rx (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 radiactivo 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 bien (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-γ. En resumen, las placas HA-Multiscreen (Millipore) se recubrieron con 100 µl de anticuerpo anti-IFN-γ 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-γ 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-γ 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 anticuerpo 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 anticuerpo biespecífico 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.

[0115] También se examinó si la presentación de antígenos de células tumorales dependía de moléculas coestimuladoras. 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).

[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.

## Discusión

[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 epítipo 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.

[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.

[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>

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

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

$\langle 210 \rangle$  3

10      <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

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

&lt;212&gt; PRT

30

$\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido sintético

<400> 4

35

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

40       $\langle 210 \rangle$  5

$\langle 211 \rangle$  30

<212> ADN

### <213> Secuencia artificial

45      <220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 5

ggaggcacct tcagcagcta tgctatcagc 30

50

$\langle 210 \rangle$  6

<211> 51

<212> ADN

### <213> Secuencia artificial

55

<223> Polinucleótido sintético

<400> 6

60      gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 7

$\langle 211 \rangle$  30

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<223> Polinucleótido sintéticoe

5 cggattcccc cgtactacgg tatggacgtc 30

<211> 13

10 <213> Secuencia artificial

<223> Polipéptido sintético

15      <400> 8

20

 $\langle 211 \rangle$  7

<213> Secuencia artificial

25

<223> Polipéptido sintético

30

35

$\langle 211 \rangle$  11

<213> Secuencia artificial

40

<223> Polipéptido sintético

<400> 10

45

<211> 39

50

### <213> Secuencia artificial

<223> Polinucleótido sintético

55

tctggaagca gctccaacat cggaagtaat tatgtatac 39

$\langle 211 \rangle$  21

**<213> Secuencia artificial**

65

<223> Polinucleótido sintético



<400> 12  
aggagtaatc agcgccctc a 21

<210> 13  
5 <211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Polinucleótido sintético

<400> 13  
gcagcatggg atgacagcct gaatggtgtg gta 33

<210> 14  
15 <211> 119  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Polipéptido sintético

<400> 14

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

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

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

40       Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
          50                  55                  60

45       Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
          65                  70                  75                  80

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

55       Ala Arg Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                  100                  105                  110

60       Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
          115

<210> 15  
<211> 357  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 15

5 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc 120  
 10 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180  
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcgagcg aatccacgag cacagcctac 240  
 15 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacggatt 300  
 ccccgctact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcacogt ctcctca 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>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 17

5	cagactgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tottgtttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccaacagctc	120
10	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg	240
	tcogtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgga	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

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

<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
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg      240
tccgtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgga      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc      360
ggcggctctg gtggtggatc cctcgagatg gcccaggtgc agctggtgca gtctggggct      420
gaggtgaaga agcctgggtc ctcgggtgaag gtctcctgca aggccttctgg aggcaccttc      480
agcagctatg ctatcagctg ggtgcgacag gccctggac aagggttga gtggatggga      540
gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg cagagtcacg      600
attaccgagg acgaatccac gagcacagcc tacatggagc tgagcagcct gagatctgag      660
gacacggccg tgtattactg tgcgagacgg attcccccggt actacggtat ggacgtctgg      720
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca      750
    
```

35

<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
    
```

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5     <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 22

Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile  
 1                        5

<210> 23  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20     <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 23  
 ggggacagtg tctctagcaa cagtgtcgtc tggaac 36

25     <210> 24  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30     <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 24  
 aggcataact acgggtccaa gtgttataat gattatgcag tatctgtgaa aagt 54

35     <210> 25  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40     <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

45     <400> 25  
 ggtcgcttag gggatgcttt tgatatc 27

      <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50     <220>  
 <223> Polipéptido sintético

55     <400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn  
 1                        5                        10

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



<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 cagctattta aat 33  
       <210> 30  
       <211> 21  
 35    <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 40    <223> Polinucleótido sintético  
       <400> 30  
       gctgcatcca gtttgcaaag 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

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  
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

<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 ctgcttgga ctggatcagg 120  
 cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacgggct caagtggat 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

<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

45	gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	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 cccctctcac tttcggcgga	300
	gggaccaaag tggatatcaa acgt	324

55 <210> 36

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 36

65

	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					
70	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	
	225					230					235					240	
75	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
					245					250							

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

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 37

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggtatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga      300
gggaccaaaag tggatatcaa acgttctaga ggtggtggtg gtagcggcgg 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
    
```

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 38

```

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

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 39

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 tcaccaactt ctggatcagc 30  
  
<210> 42  
<211> 51  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Polinucleótido sintético  
40  
<400> 42  
agggtgatc ctggctactc ttagtcacc tacagcccgt cctccaagg c 51  
  
<210> 43  
45 <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



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  
 <220>  
 25 <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  
 <400> 47  
 tctggaagca gctccaacat cggaagtaat actgtaaac 39

45 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 48  
 55 agtaataatc agcggccctc a 21

60 <210> 49  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

65 <400> 49  
 gcagcatggg atgacagcct gaatggtgg gtg 33

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 50

```

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    
```

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

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 51

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

<210> 52  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

<210> 53  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 53

# ES 2 742 224 T3

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

15 <210> 54  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <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 15  
 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

45  
 50  
 55  
 60  
 65

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 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 ccccaaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 5 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgggtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc 360  
 10 ggcggctctg gtggtggtgg atccctcgag atggcccaga tgcagctggt gcagtccgga 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 tgactgggtc 720  
 gaccctggg gccaggggaac cctggtcacc gtctcctca 759

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

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

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

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

<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

Gly

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

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

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

<210> 59  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 59  
 10 ggctacaact ttagcaacaa gtggatcggc 30  
 <210> 60  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 20 <400> 60  
 atcatctatc ccggttactc 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>



<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

$\langle 220 \rangle$

15 <223> Polinucleótido sintético

<400> 65

cgggccagtc agaatatcaa taagtggctg gcc 33

20      <210> 66

$\langle 211 \rangle$  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

$\langle 220 \rangle$

<223> Polinucleótido sintético

<400> 67

40 caacaatata atagttatgc gacg 24

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido sintético

50      <400> 68

55

60

65

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

<210> 69  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 69

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

<210> 70  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 70

	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 gggccagtc gaatatcaat aagtggctgg cctggtatca gcagagacca	120
	gggaaagccc ctcagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
50	gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatagtt atgcgacgtt cggccaaggg	300
	accaaggtgg aaatcaaacg t	321
55	<210> 72	
	<211> 246	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Polipéptido sintético	
	<400> 72	
65		

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

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

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

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 73

```

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca      60
atcacttgcc gggccagtca gaatatcaat aagtggctgg cctggtatca gcagagacca      120
gggaaagccc ctcagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gatgatTTTg caacttatta ctgccaaaca tataatagtt atgcgacggt cggccaaggg      300
accaaggtgg aaatcaaacg ttctagaggt ggtggtggtg gcggcggcgg cggctctggt      360
ggtggtggat ccctcgagat ggcccaggtg cagctggtgc agtctggagc agaggtgaaa      420
aagcccggag agtctctgaa gatctcctgt aagggttctg gctacaactt tagcaacaag      480
tggatcggct ggggtgcgcca attgcccggg agaggcctgg agtggatagc aatcatctat      540
cccgttact cggacatcac ctacagcccg tccttccaag gccgcgtcac catctccgcc      600
gacacgtcca ttaacaccgc ctacctgcac tggcacagcc tgaaggcctc ggacaccgcc      660
atgtattatt gtgtgcgaca cacagctttg gccggctttg actactgggg cctgggcacc      720
ctggtcaccg tctcctca                                     738
    
```

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 74

```

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

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 75

	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  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

50 <400> 79  
 gagcgtggct acgggtacca tgatcccat gactac 36

55 <210> 80  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 80

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

65

<210> 81  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 81  
 10  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5  
 15  
 <210> 82  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 82  
 25  
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val  
 1 5 10  
 30  
 <210> 83  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 83  
 gggagaaaca acattggaag taaaagtggtg cac 33  
 40  
 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 84  
 gatgatagcg accggccctc a 21  
 50  
 <210> 85  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 85  
 60 caggtgtggg atagtagtag tgatcatgtg gta 33  
 <210> 86  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 65 <213> Secuencia artificial



<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 cctctggggtt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120

55 ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacagggtat 180

gcagactctg tgagggggcog attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagagcgt 300

60 ggctacgggt accatgatcc ccatgactac tggggccaag gcaccctggt gaccgtctcc 360

tca 363

65 <210> 88

<211> 109

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <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 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	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 agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc	120
60	caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc	300
	ggagggacca agctgaccgt cctaggt	327

<210> 90

<211> 249

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <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
	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	195 200 205
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	210 215 220
	Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr Trp Gly	225 230 235 240
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	245

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

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 91

10

```

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt      60
acctgtggga gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc      120
caggccccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg      240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc      300
ggagggacca agctgaccgt cctaggttct agaggtggtg gtggtagcgg cggcggcggc      360
tctggtggat ccctcgagat ggccgaagtg cagctggtgc agtctggggg aggtgtggta      420
cggcctgggg ggtccctgag actctcctgt gcagcctctg gggtcacctt tgatgattat      480
ggcatgagct ggggtccgca agctccaggg aaggggctgg agtgggtctc tggattaat      540
tggaatggtg gtagcacagg ttatgcagac tctgtgaggg gccgattcac catctccaga      600
gacaacgcca agaactccct gtatctgcaa atgaacagtc tgagagccga ggacacggcc      660
ttgtattact gtgcgagaga gcgtggctac gggtagcatg atcccatga ctactggggc      720
caaggcacco tggtgaccgt ctccctca      747
    
```

<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

<210> 94  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 94  
 10  
 Gly Gly Ala Gly Gly Gly His Phe Asp Ser  
 1 5 10  
 15  
 <210> 95  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 95  
 gggttctccg tcagtggcac ctacatgggc 30  
 25  
 <210> 96  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 96  
 35  
 cttctttata gtggtggcgg cacataccac ccagcgtccc tgcagggc 48  
 <210> 97  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 40  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 45  
 <400> 97  
 gaggggcagg aggtggccac ttgactcc 29  
 <210> 98  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 50  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55  
 <400> 98  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His  
 1 5 10  
 60  
 <210> 99  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 65  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 99  
 5  
 Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser  
 1 5  
 <210> 100  
 10 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <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  
 <210> 103  
 45 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 103  
 gcagcatggg atgacagcct gaatggttat gtc 33  
 55 <210> 104  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 104  
 65

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 ccagggaagg gactggagtg ggtcgcaact 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



<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

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

45

<400> 107

50	cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagt tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
	tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagggttatg atgtacactg gtaccagcag	120
	cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc	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

<213> Secuencia artificial

65

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido sintético

&lt;400&gt; 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

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
	tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagggttatg atgtacactg gtaccagcag	120
5	cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc	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 gggggggtcc ctcagactct cctgtgcagc ctctgggttc	480
	tccgtcagtg gcacctacat gggctgggtc cgccaggctc caggggaaggg actggagtgg	540
20	gtcgcacttc tttatagtgg tggcggcaca taccaccag cgtccctgca gggccgattc	600
	atcgtctcca gagacagctc caagaatatg gtctatcttc aaatgaatag 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

	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		

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

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val  
 450 455 460  
 5  
 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



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

5

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

10 &lt;400&gt; 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

&lt;400&gt; 113

60

65

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

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

5

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 114

10

caggctgtcg tgactcagcc tccttctgct tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60

tctgctccg gctcctcctc caacatcggc tccaacaccg tgaactggta tcagcaggtg 120

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	cccgccaccg cccccaagct gctgatctac tctaacaacc agcgccctc cggcgtgccc	180
	gacagattct ctggctctaa gtccggcacc tccgcctccc tggctatctc tggcctgcag	240
5	tctgaggacg aggccgacta ctactgcgcc gcctgggacg attctctgaa cggctgggtg	300
	ttcggcggag gcaccaagct gacagtgtctg ggaagtagag gcggtggcgg atctgggtggc	360
10	ggaggatctg gcggaggggg ctctctggaa atggcccaga tgcagctggt gcagtctggc	420
	gccgaagtga aagagcctgg cgagtcctctg cggatctcct gcaagggctc cggctacagc	480
	tttaccact tctggatcag ctgggtgcga cagatgcccg gcaagggcct ggaatggatg	540
15	ggcagagtgg accccggcta ctctactcc acctactccc ccagcttcca gggccacgtg	600
	accatcagcg ccgacaagtc tacctccacc gcctacctgc agtggaaactc cctgaaggcc	660
20	tccgacaccg ccattgtacta ctgtgcccg gtgcagtaca gcggctacta cgattggttc	720
	gacccctggg gccagggcac cctcgtgaca gtgtctagtg gcgggggagg atccgacgtg	780
	cagctggtgc agagcggagc tgaagtgaag aaacctggcg cctccgtgaa ggtgtcctgc	840
25	aaagctagcg gctatacctt cacccggtac accatgcaact ggggtgcgcca ggcacctgga	900
	cagggactgg aatggatcgg ctacatcaac cctcccggg gctacaccaa ctacgccgac	960
30	tctgtgaagg gccgggtcac catcaccacc gataagtcca ccagcaccgc ttacatggaa	1020
	ctgtcctccc tgagatccga ggacaccgct acctactatt gcgcccggta ctacgacgac	1080
	cactactgcc tggactactg gggacagga accacagtga ccgtgtcctc tggcgagggc	1140
35	acctctactg gatctggggg aagtgggtgt tctggcggcg ctgacgacat cgtgctgacc	1200
	cagtctccag ccacctgtc tctgagccca ggcgagagag ctacctgtc ctgcagagcc	1260
40	tcccagtccg tgtcctacat gaattggtat cagcagaagc ctggcaaggc ccctaagcgg	1320
	tggatctacg acacctccaa ggtggcctct ggcgtgccag cccggttttc cggatctggc	1380
	tctggcaccg actactcctt gaccatcaac agcctggaag ccgaggacgc tgccacctat	1440
45	tactgccagc agtggctctc caacccctg acctttggag gcggcaccaa ggtggaaatc	1500
	aag	1503

- 50
- <210> 115
  - <211> 1575
  - <212> ADN
  - <213> Secuencia artificial
- 55
- <220>
  - <223> Polinucleótido sintético
- 60
- <400> 115
- 65

	atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcca ggctgtcgtg	60
5	actcagcctc cttctgcttc tggcaccctt ggccagagag tgaccatctc ctgctccggc	120
	tcctcctcca acatcggtc caacaccgtg aactgggtatc agcaggtgcc cggcaccgcc	180
10	cccaagctgc tgatctactc taacaaccag cggccctccg gcgtgcccga cagattctct	240
	ggctctaagt cgggcacctc cgcctccctg gctatctctg gcctgcagtc tgaggacgag	300
	gccgactact actgcgccgc ctgggacgat tctctgaacg gctgggtgtt cggcggaggc	360
15	accaagctga cagtgtctgg aagtagaggc ggtggcggat ctggtggcgg aggatctggc	420
	ggaggggggt ctctggaaat ggcccagatg cagctggtgc agtctggcgc cgaagtgaat	480
20	gagcctggcg agtccctgcg gatctcctgc aagggctccg gctacagctt taccaacttc	540
	tggatcagct ggggtgcgaca gatgcccggc aagggcctgg aatggatggg cagagtggac	600
	cccggctact cctactccac ctactcccc agcttccagg gccacgtgac catcagcgcc	660
25	gacaagtcta cctccaccgc ctacctgcag tggaaactccc tgaaggcctc cgacaccgcc	720
	atgtactact gtgcccgggt gcagtacagc ggctactacg attggttcga cccctggggc	780
30	cagggcacc cctgtgacagt gtctagtggc gggggaggat ccgacgtgca gctggtgcag	840
	agcggagctg aagtgaagaa acctggcgcc tccgtgaagg tgcctgcaa agctagcggc	900
	tataccttca cccgggtacac catgcactgg gtgcgccagg cacctggaca gggactggaa	960
35	tggatcgggt acatcaaccc ctcccggggc tacaccaact acgcogactc tgtgaagggc	1020
	cggttcacca tcaccaccga taagtccacc agcaccgctt acatggaact gtcctccctg	1080
40	agatccgagg acaccgctac ctactattgc gcccggtact acgacgacca ctactgcctg	1140
	gactactggg gacaggggaa cacagtgacc gtgtcctctg gcgagggcac ctctactgga	1200
	tctgggggaa gtggtggttc tggcggcgct gacgacatcg tgctgacca gtctccagcc	1260
45	accctgtctc tgagcccagg cgagagagct accctgtcct gcagagcctc ccagtccgtg	1320
	tcctacatga attggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagcgggtg gatctacgac	1380
50	acctccaagg tggcctctgg cgtgccagcc cggttttccg gatctggctc tggcaccgac	1440
	tactccctga ccatcaacag cctggaagcc gaggaogctg ccacctatta ctgccagcag	1500
	tggtoctcca accccctgac ctttggaggg 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

		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

		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

40 ggatacagct tcaccaactt ctggatcagc 30

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

45 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

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

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

55 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético

60 <400> 121  
 gtacaatata gtggctacta tgactggttc gacccc 36

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

65

<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

                                  Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
                                  1                   5

25 <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

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

45 <400> 125

tctggaagca gctccaacat cggaagtaat actgtaaac 39

<210> 126

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Polinucleótido sintético

<400> 126

agtaataatc agcgccctc a 21

60 <210> 127

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 127  
gcagcatggg atgacagcct gaatggttg 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



	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

	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

	cagatgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaaagagc ctggcgagtc cctgcccgatc	60
	tectgcaagg gctccggcta ctcttttacc aacttctgga tcagctgggt ggcacagatg	120
5	cccggaagg gcctggaatg gatgggcaga gtggaccccg gctacagcta ctccacctac	180
	tccccagct tccagggcca cgtgaccatc tccgcccaga agtctacctc caccgcctac	240
10	ctgcagtgga actccctgaa ggccctccgac accgccatgt actactgcgc cagagtgcag	300
	tacagcggct actacgattg gttcgacccc tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtcc	360
	tctgcttcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	420
15	gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	480
	tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccgccctg cctacagtcc	540
20	tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag	660
	cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	720
25	ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	780
	cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
30	tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
	gccagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
	aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
35	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat	1080
	gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
40	atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccctccc	1200
	gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc tcaccgtgga caagagcagg	1260
	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
45	acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga	1356

<210> 130

<211> 216

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

55

<400> 130

60

65

	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50						55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	
					85					90					95		
30	Asn	Gly	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	
			115					120					125				
40	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	
	130						135					140					
45	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys	
	145					150					155					160	
50	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	
					165					170					175		
55	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	
				180					185					190			
60	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	
			195					200					205				
65	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser									
	210						215										
	<210> 131																
	<211> 651																

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polinucleótido sintético

<400> 131

```

10      caggctgtcg tgactcagcc tccttctgct tctggcaccg ctggccagag agtgaccatc      60
      tctctgtccg gctcctcctc caacatcggc tccaacaccg tgaactggta tcagcaggtg      120
      cccggcaccg cccccaagct gctgatctac tctaacaacc agcggccctc cggcgtgccc      180
15      gacagattct ctggctctaa gtcgggcacc tccgcctccc tggctatctc tggcctgcag      240
      tctgaggacg agggcgacta ctactgcgcc gcctgggacg attctctgaa cggctgggtg      300
      ttggcgagag gcaccaagct gacagtgtgt ggccagccta aggcccaacc taccgtgacc      360
20      ctgttccccc catectccga ggaactgcag gctaacaagg ccaccctcgt gtgcctgac      420
      tccgacttct accctggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ctgatggatc tcctgtgaag      480
      gccggcgtgg aaaccaccaa gccctccaag cagtccaaca acaaatacgc cgcctcctcc      540
25      tacctgtccc tgaccctga gcaagtgaag tcccaccggt cctacagctg ccaagtgacc      600
      cacgagggct ccaccgtgga aaagaccgtg gctcctaccg agtgctccta g      651

```

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

<220>

35 <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

5 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  
 10 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc 360  
 ggcggctctg gtggtggtgg atccctcgag atggcccaga tgcagctggt gcagtccgga 420  
 gcagaggtga aagagcccgg ggagtctctg aggatctcct gtaagggttc tggatacagc 480  
 15 ttcaccaact tctggatcag ctgggtgctc cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg 540  
 gggaggggtg atcctggcta ctcttatagc acctacagcc cgtccttcca aggccacgtc 600  
 accatctcag ctgacaagtc taccagcact gcctacctgc agtggaacag cctgaaggcc 660  
 20 tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga gtacaatata gtggctacta tgactggttc 720  
 gaccctggg gccaggaac cctggtcacc gtctcctca 759

25 <210> 134  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 134

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

# 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					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
15	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			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			275					280					285				
45	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					320	
	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			



	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				
30	Lys																
35	<210>	135															
	<211>	1350															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
40	<220>																
	<223>	Polinucleótido sintético															
45	<400>	135															
50																	
55																	
60																	
65																	

	caggtgcagc tgggtgcagtc cggcggcggc gtgggtgcagc ccggccggtc cctgcggctg	60
	tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cggtagacca tgcaactgggt ggggcaggcc	120
5	cccggcaagg gcctggagtg gatcggctac atcaaccctt cccggggcta caccaactac	180
	aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgccttc	240
	ctgcagatgg actccctgag gcccgaggac accggcgtgt acttctgcgc ccggtactac	300
10	gacgaccact actgcctgga ctactggggc cagggcaccc ccgtgaccgt gtcctccgcc	360
	tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
15	aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtcctaca gtcctcagga	540
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggac ccagacctac	600
20	atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagcccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	780
25	gtcacatgag tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gacaaagccg gggaggagca gtacgccagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
30	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
	gcccgaaggc agccccgaga accacagggt tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1080
35	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
	gtggagtggt agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
	gactccgacg gctccttcct cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
40	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
	aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga	1350

45 <210> 136  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <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

gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgggtgacc 60  
 atcaactgct cgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtaccagca gacccccggc 120  
 5 aaggccccca agcgggtgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccgg 180  
 ttctccggct ccggctccgg caccgactac accttcacca tctcctccct gcagcccgag 240  
 gacatcgcca cctactactg ccagcagtgg tcctccaacc ccttcacctt cggccagggc 300  
 10 accaagctgc agatcacccg gaccgtggcc gcccctccg tgttcattt cccccctcc 360  
 gagcagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420  
 cgggaggcca aggtgcagtg gaagggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctcccaggag 480  
 15 tccgtgaccg agcaggactc caaggactcc acctactccc tgtcctccac cctgacctg 540  
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600  
 20 tcctcccccg 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

<400> 140

60

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

65

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

	<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
- (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
- 15 (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;
- 20 (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;
- 25 (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;
- 30 (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;
- 35 (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
- 40 (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;
- 45 y
- 50
- 55
- 60 (II) una segunda porción 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
- 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.

2. El anticuerpo recombinante de la reivindicación 1, en el que:

(I) la primera porción de unión a antígeno 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 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;

(II) la primera porción de unión a antígeno 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 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;

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

- (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;

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

- (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;

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

- (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

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

- (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
- (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.

**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)2; 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.

**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.

**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
- (b) se une específicamente a CD3, opcionalmente en donde dicho anticuerpo recombinante se une a una célula CD3<sup>+</sup>.

**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.

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

**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.

**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.

**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.

**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

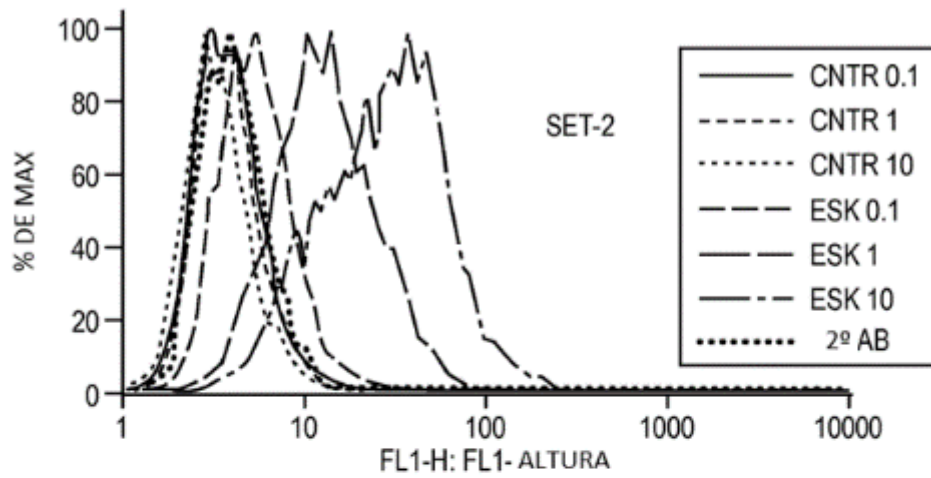
50

55

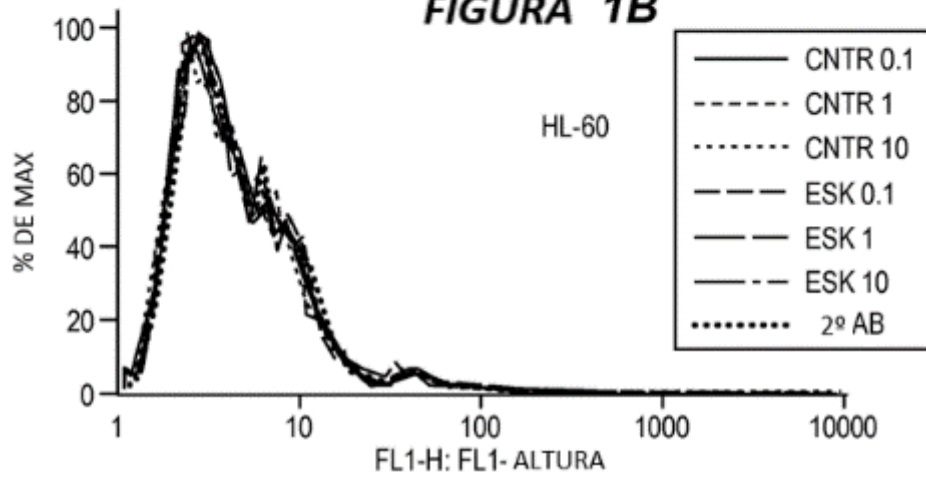
60

65

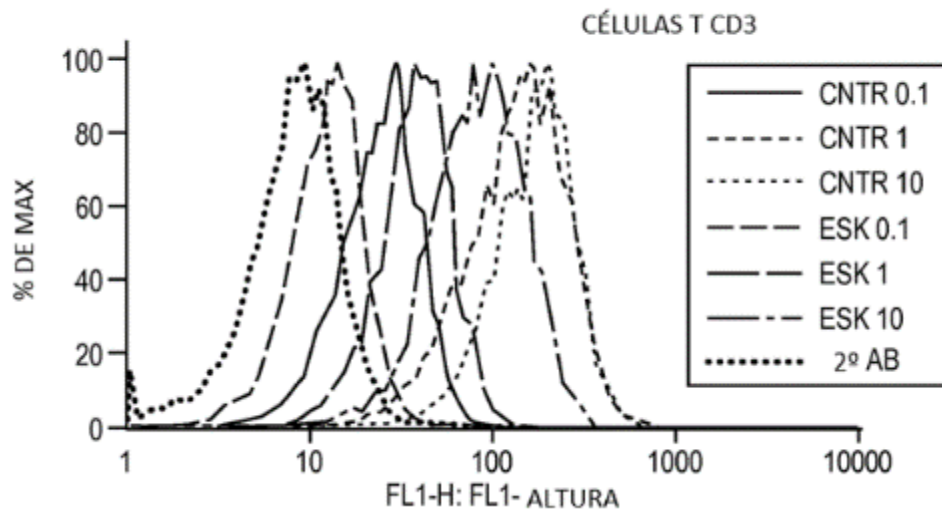
**FIGURA 1A**

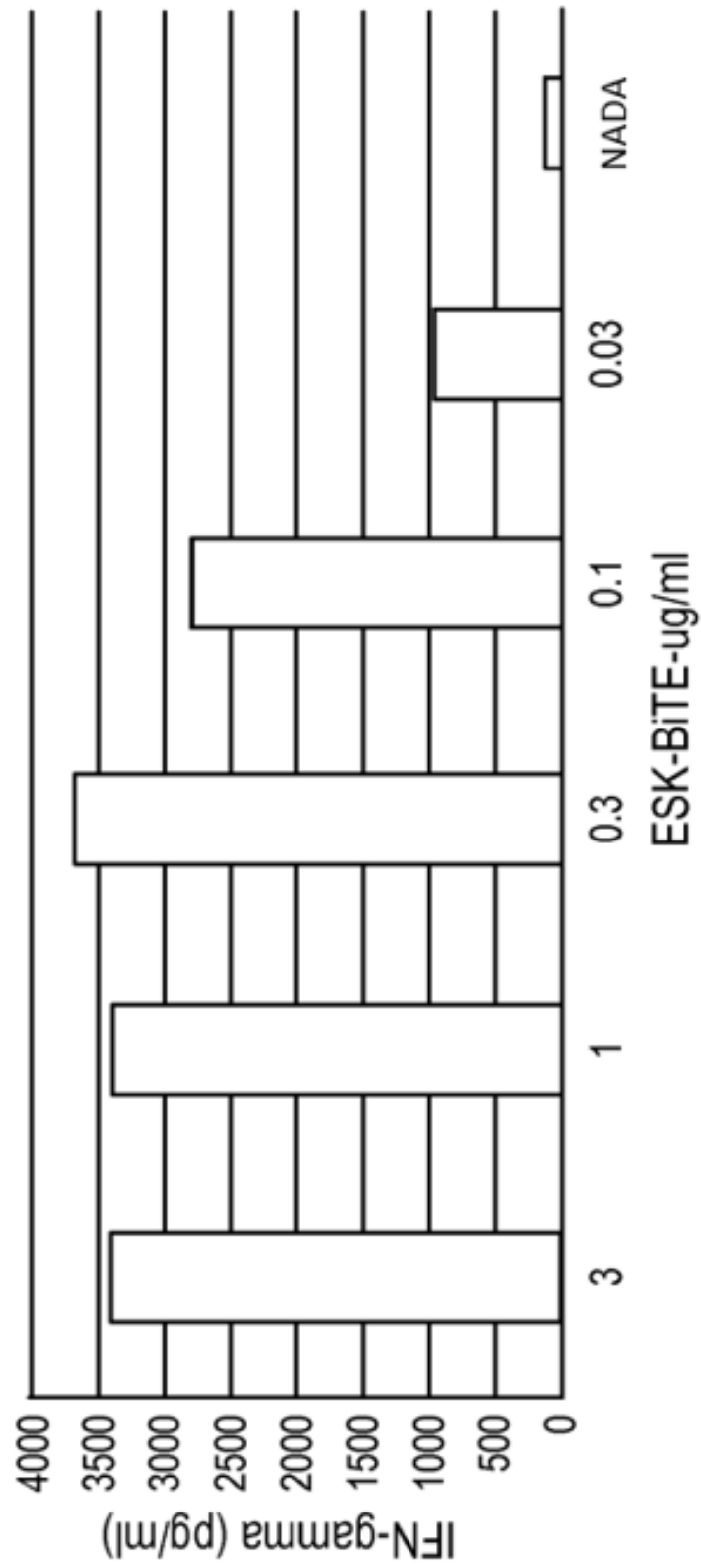


**FIGURA 1B**



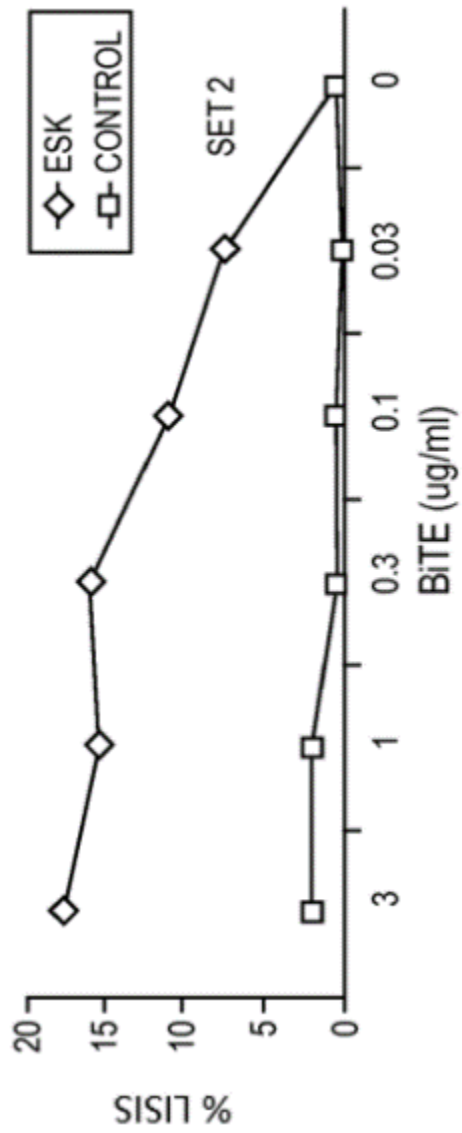
**FIGURA 1C**





**FIGURA 1D**

**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**

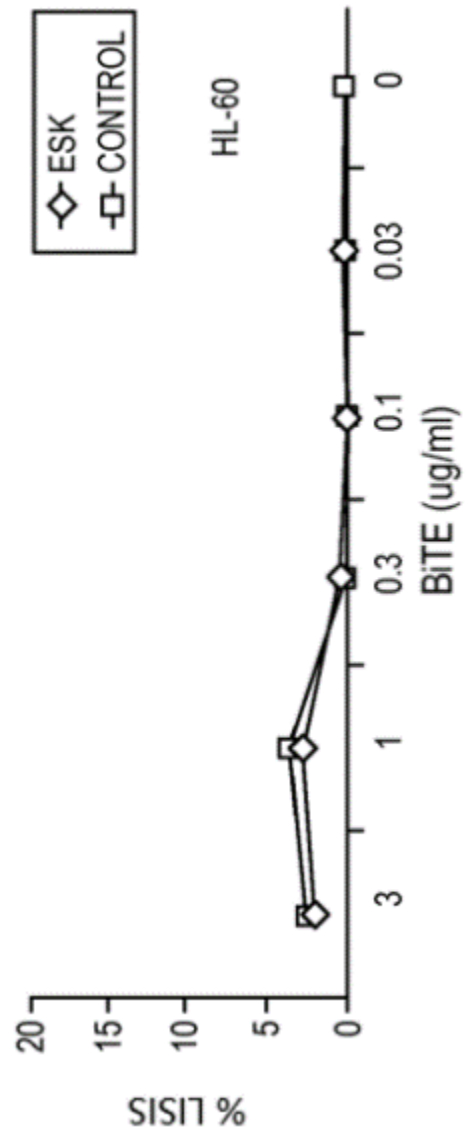


FIGURA 2C

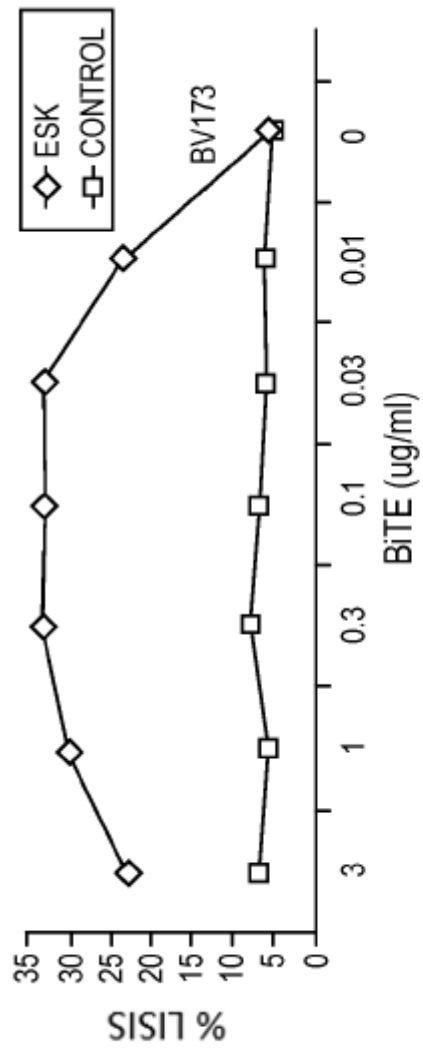
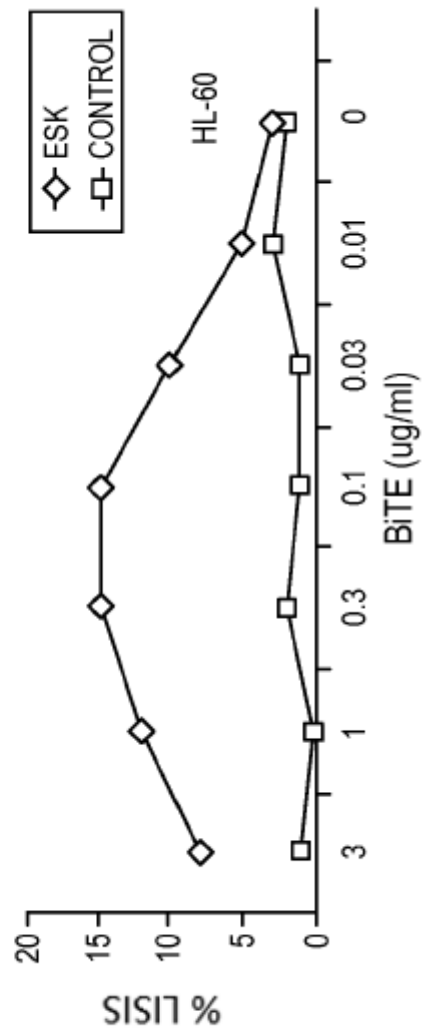
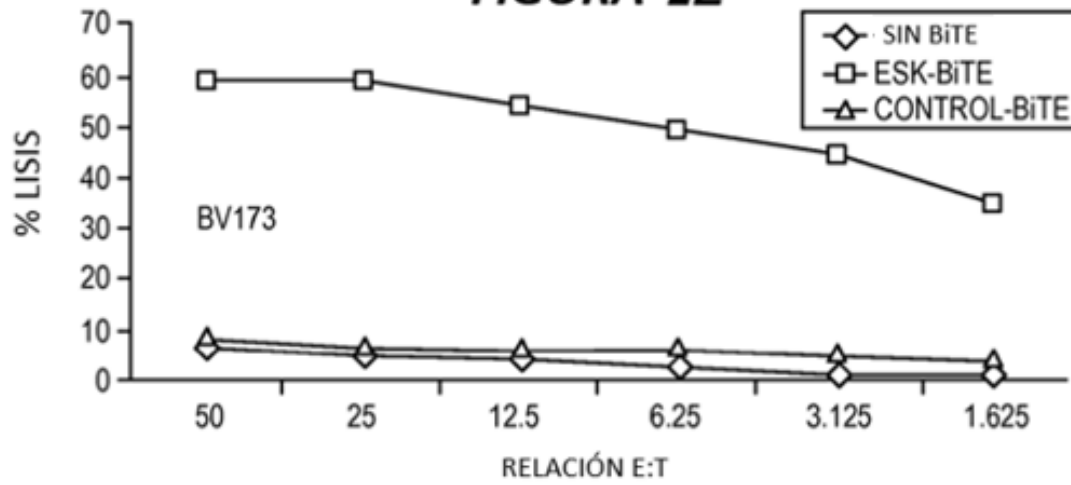


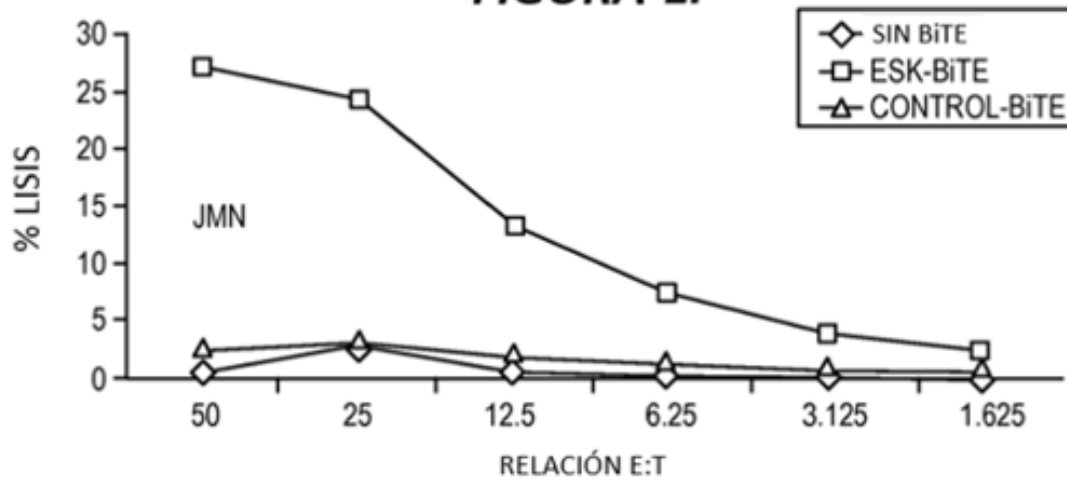
FIGURA 2D



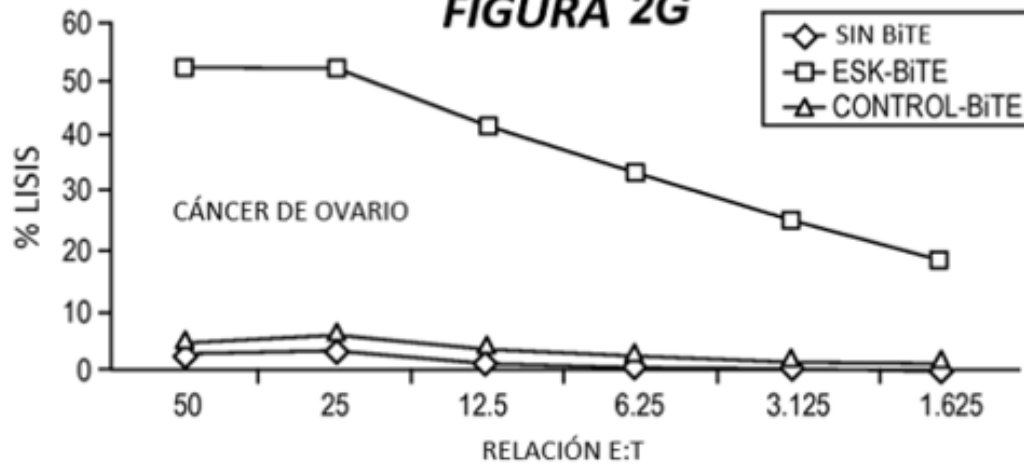
**FIGURA 2E**

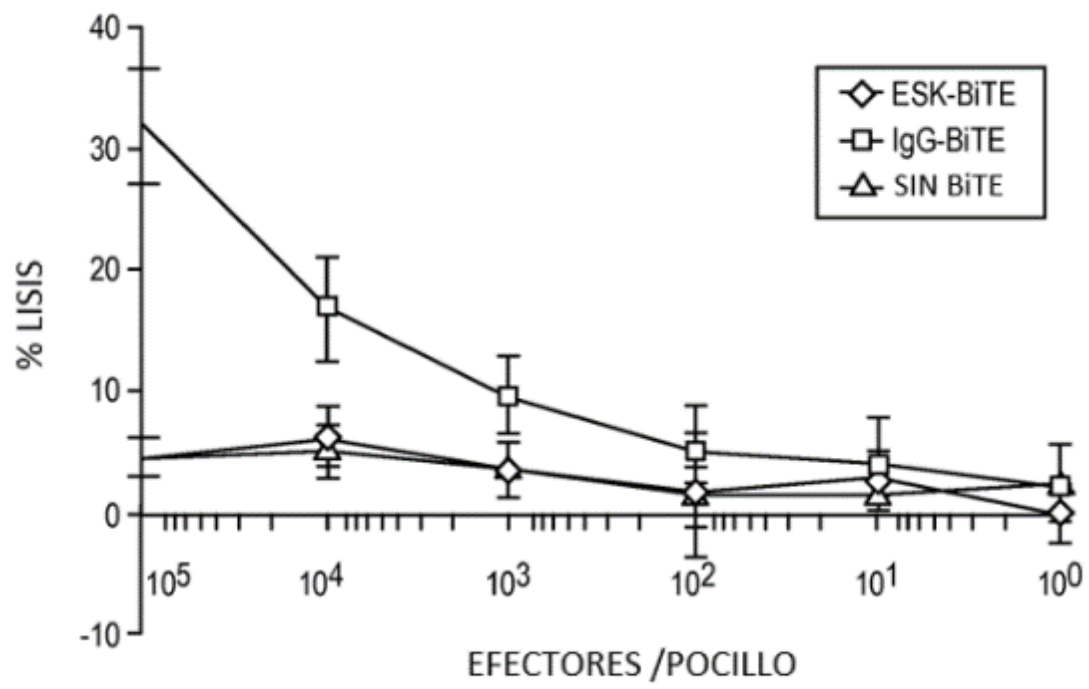


**FIGURA 2F**



**FIGURA 2G**





**FIGURA 3A**

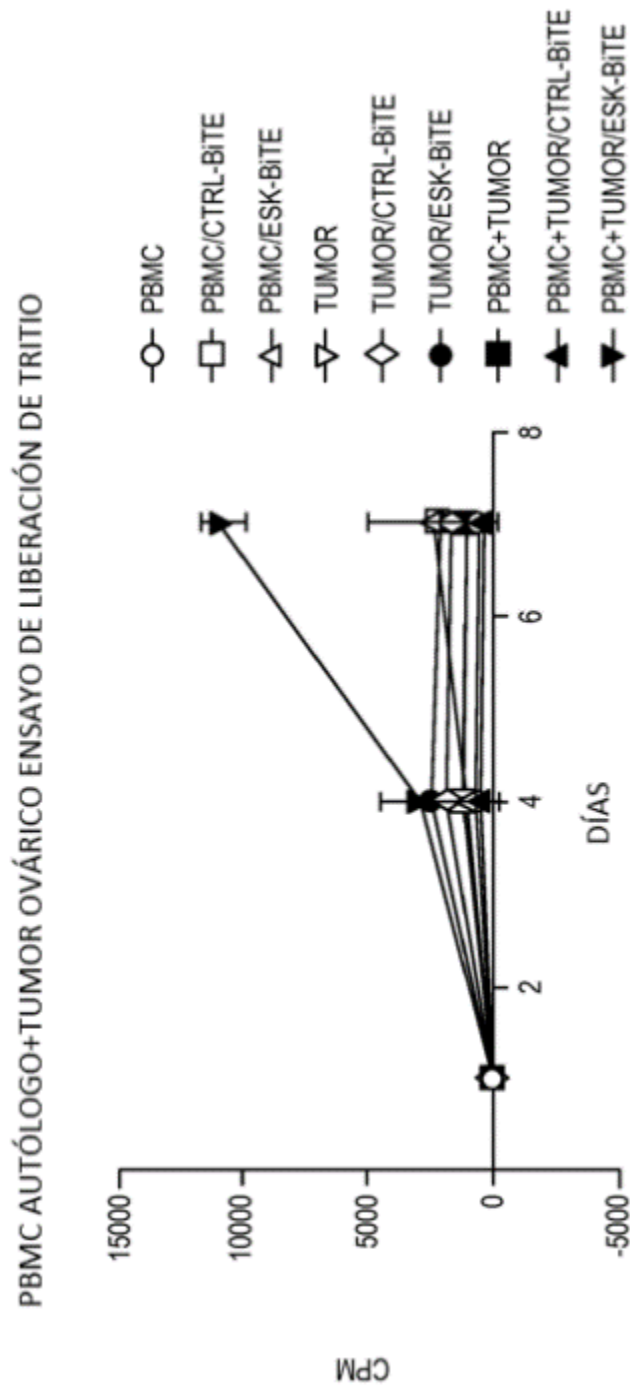
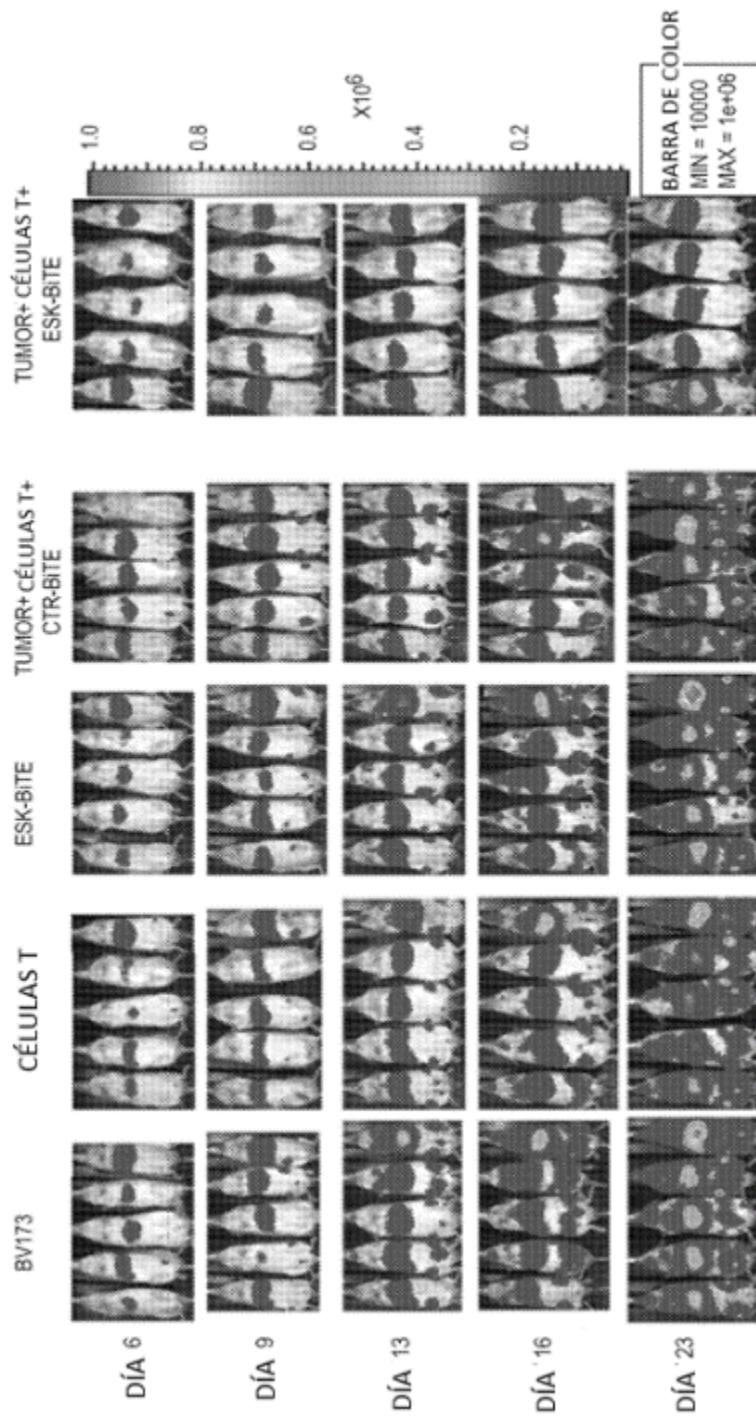


FIGURA 3B

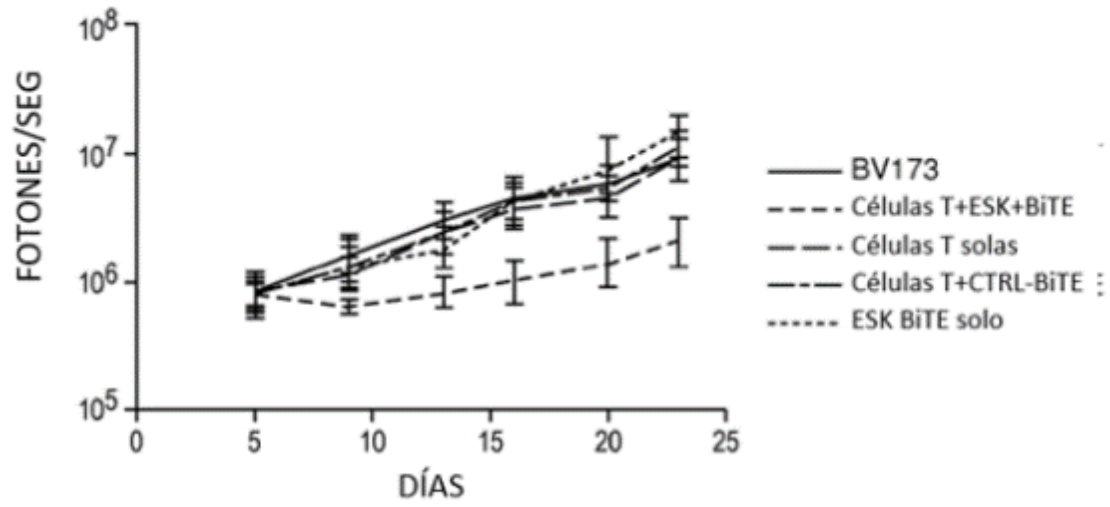


**FIGURA 4A**

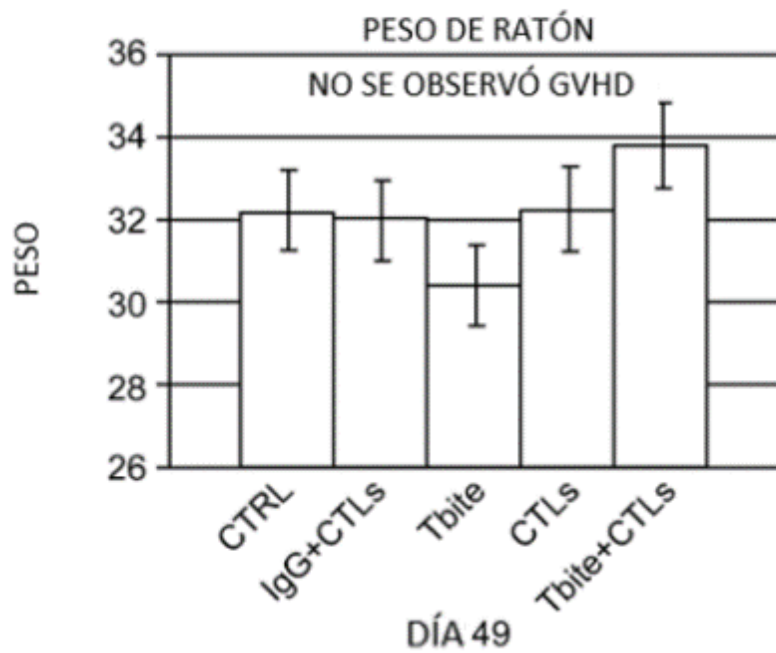


**FIGURA 4B**

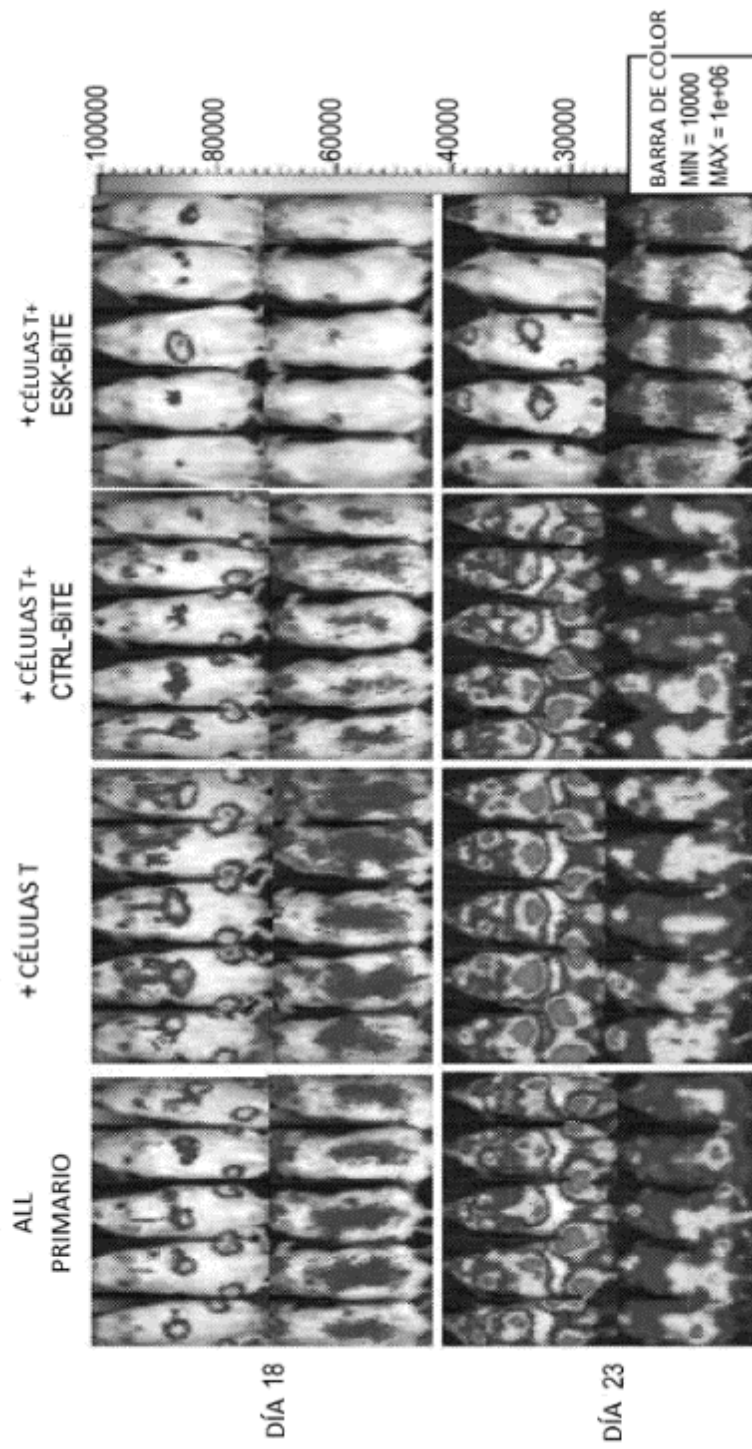
BV173

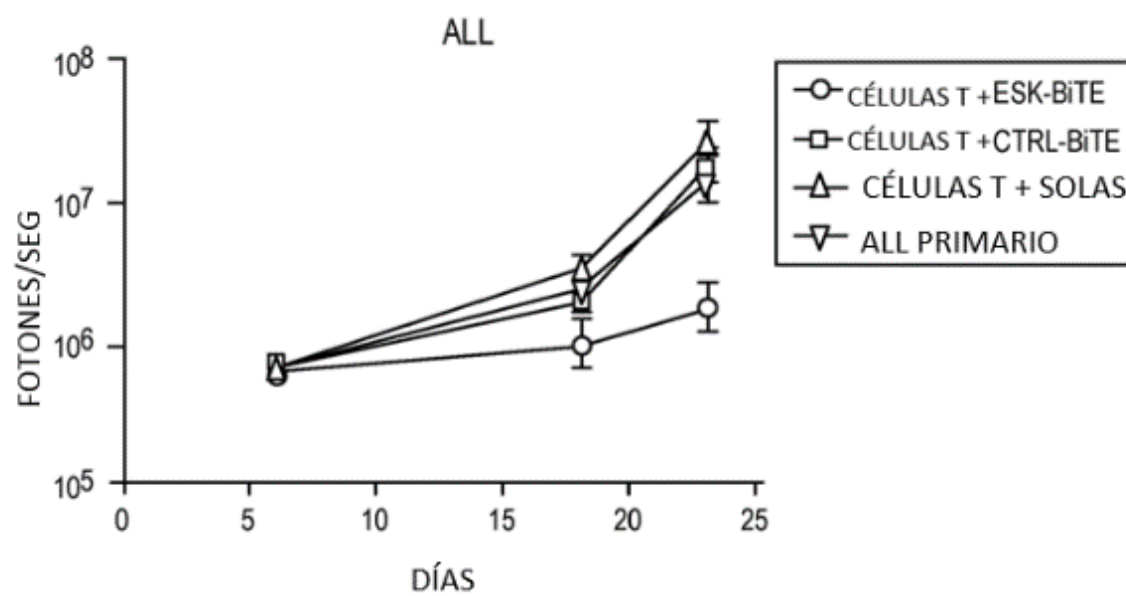


**FIGURA 4C**

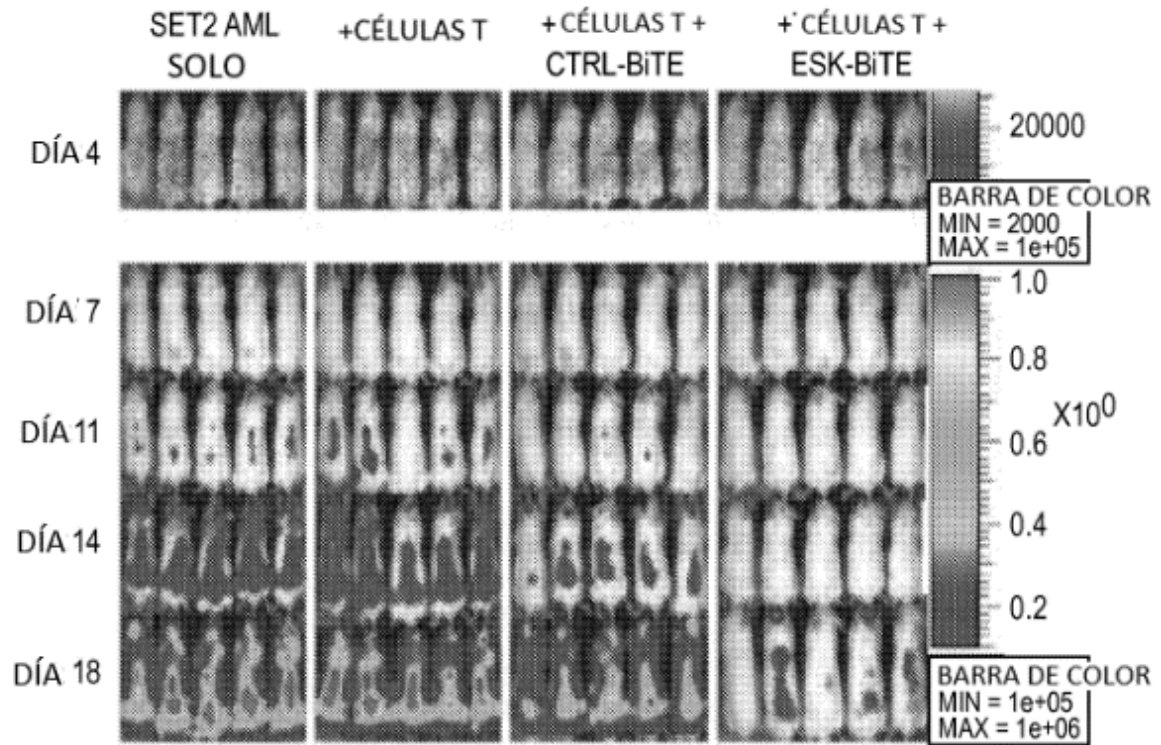


**FIGURA 4D**



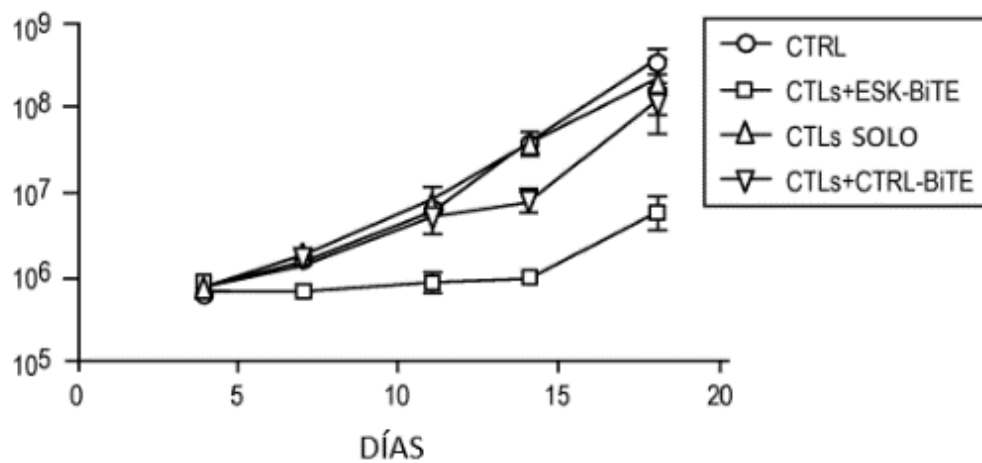
**FIGURA 4E**

**FIGURA 5A**

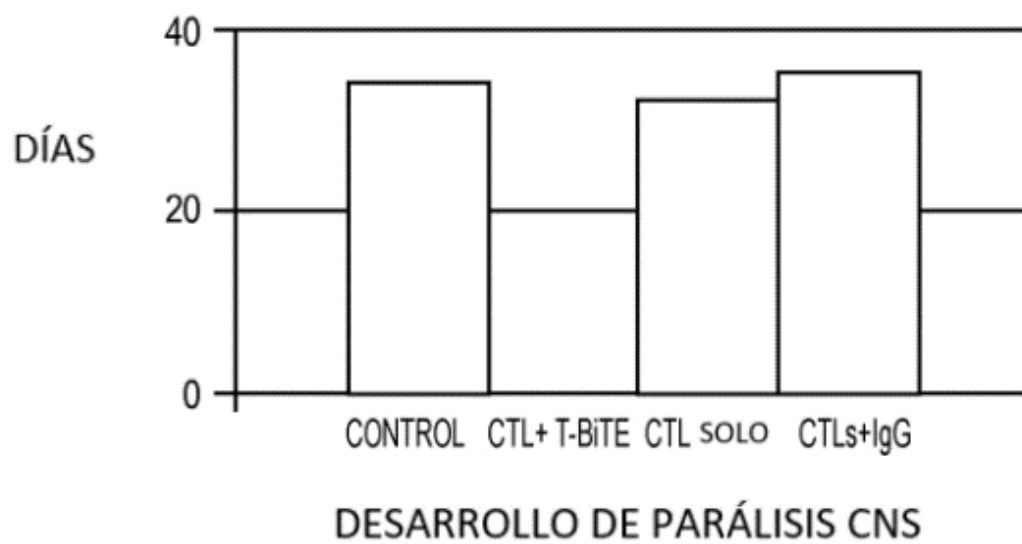


**FIGURA 5B**

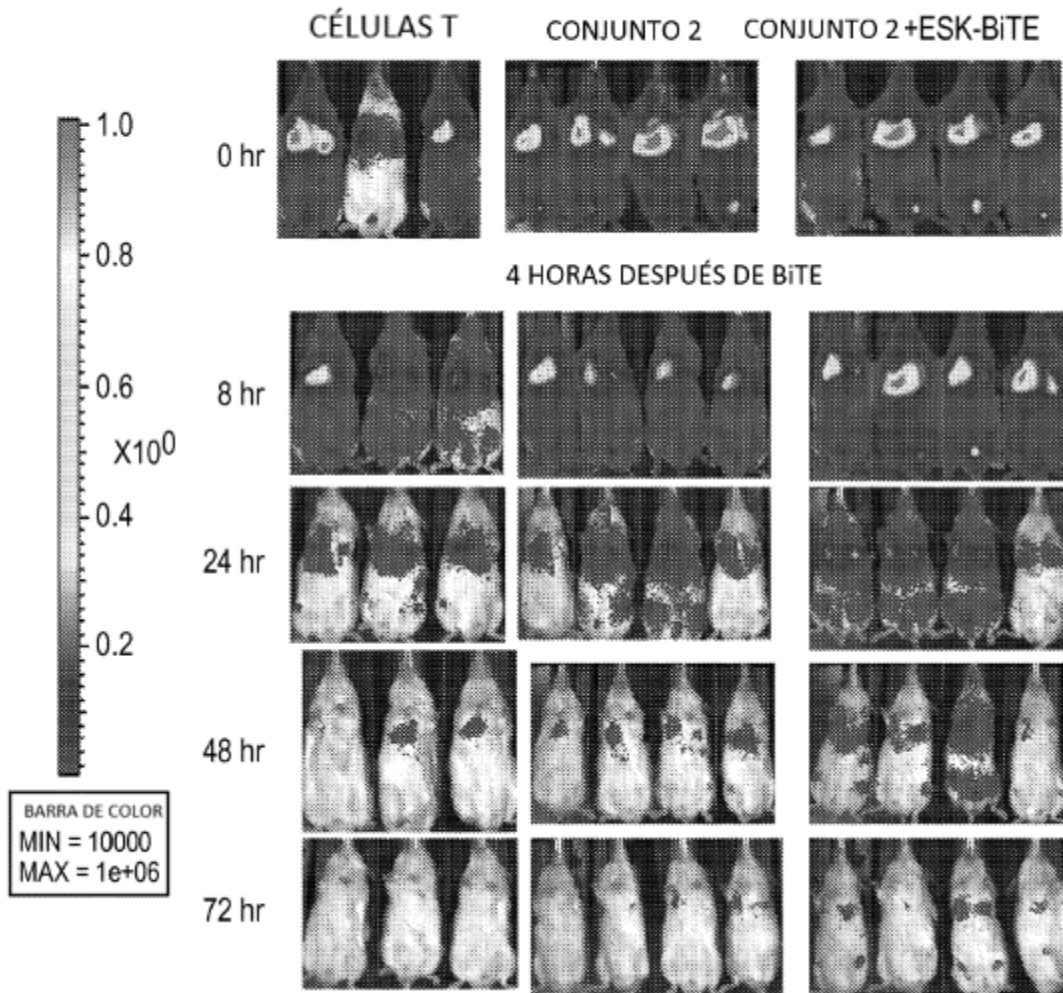
CONJUNTO 2



**FIGURA 5C**

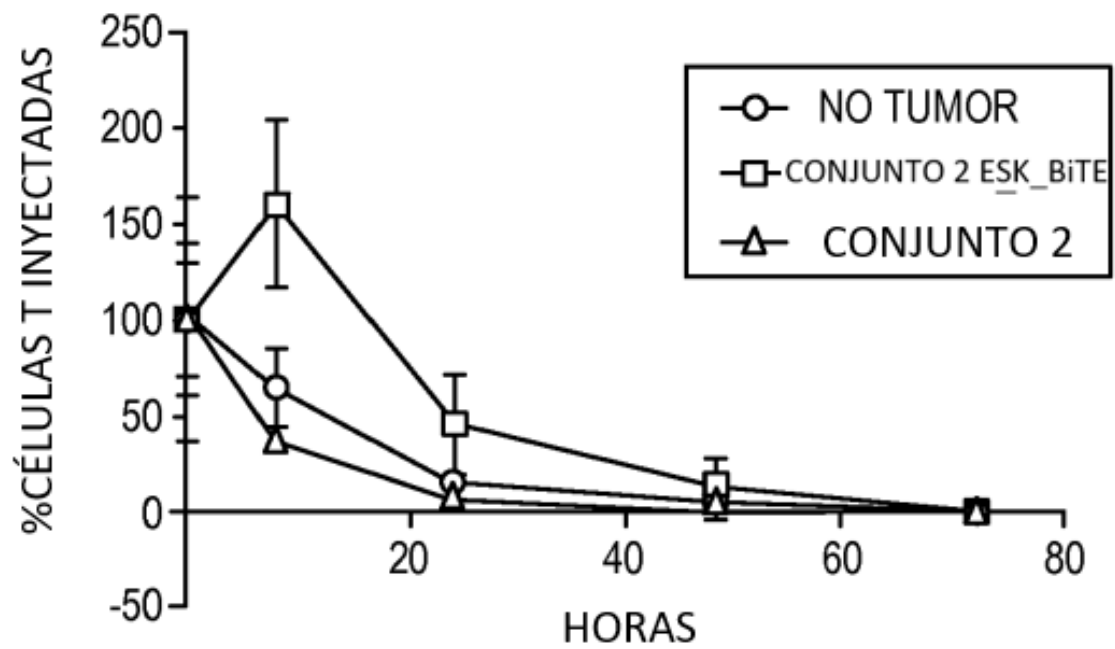


**FIGURA 6A**



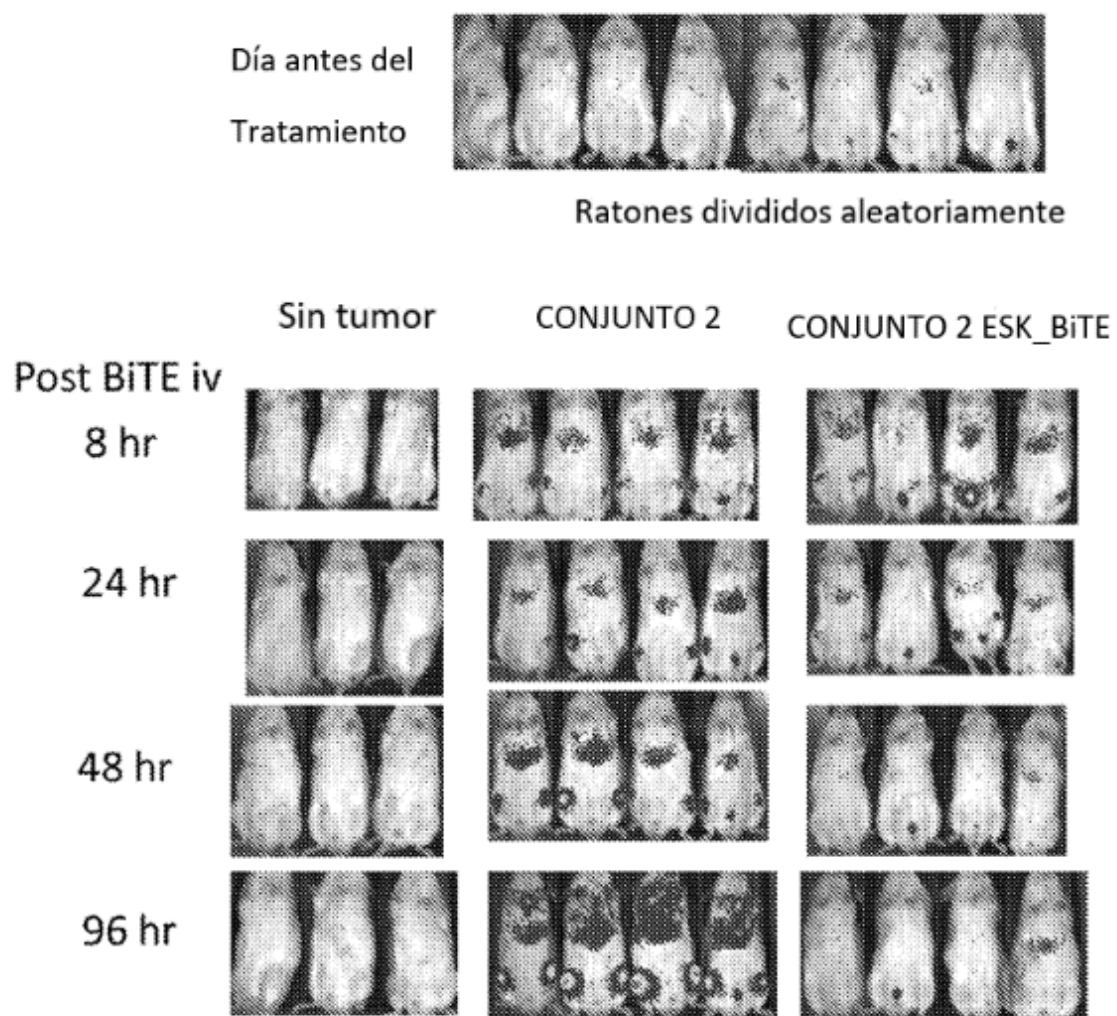
## FIGURA 6B

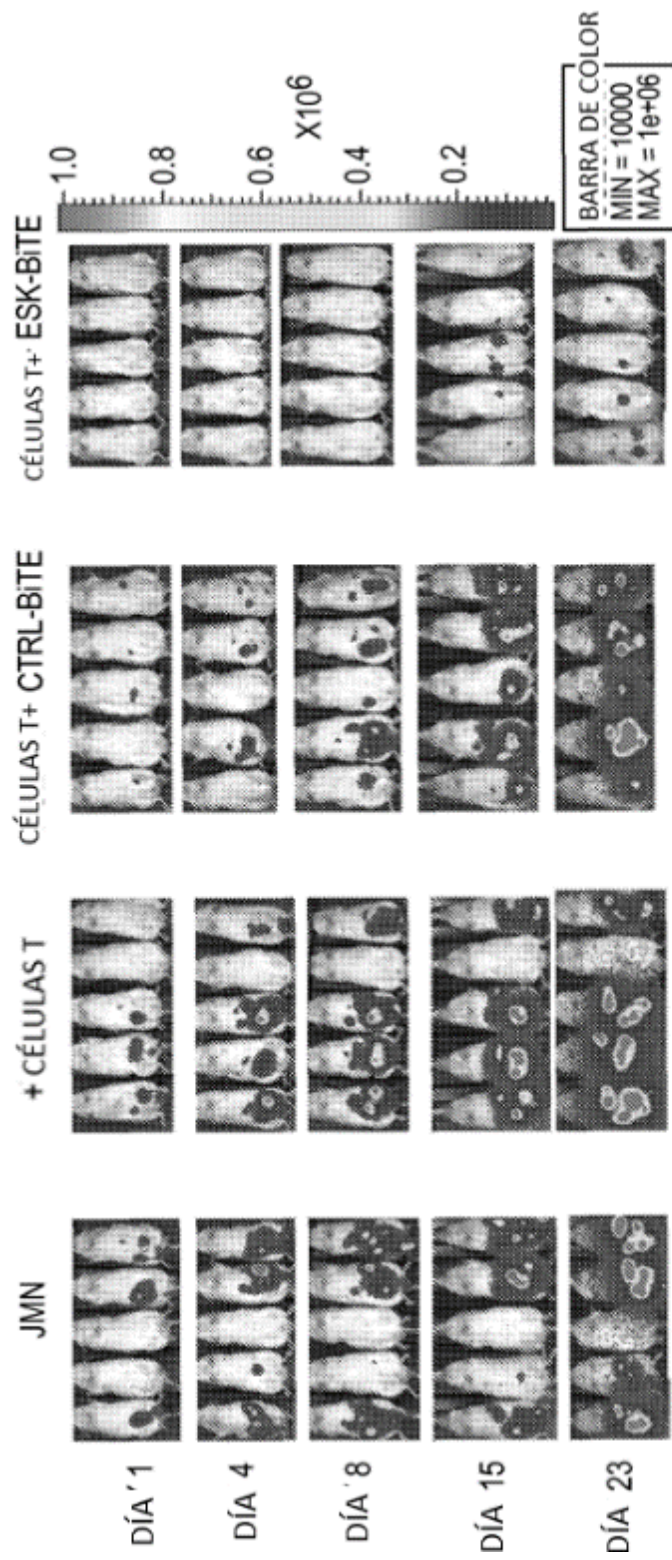
### CONJUNTO 2 CTLs RENILLA



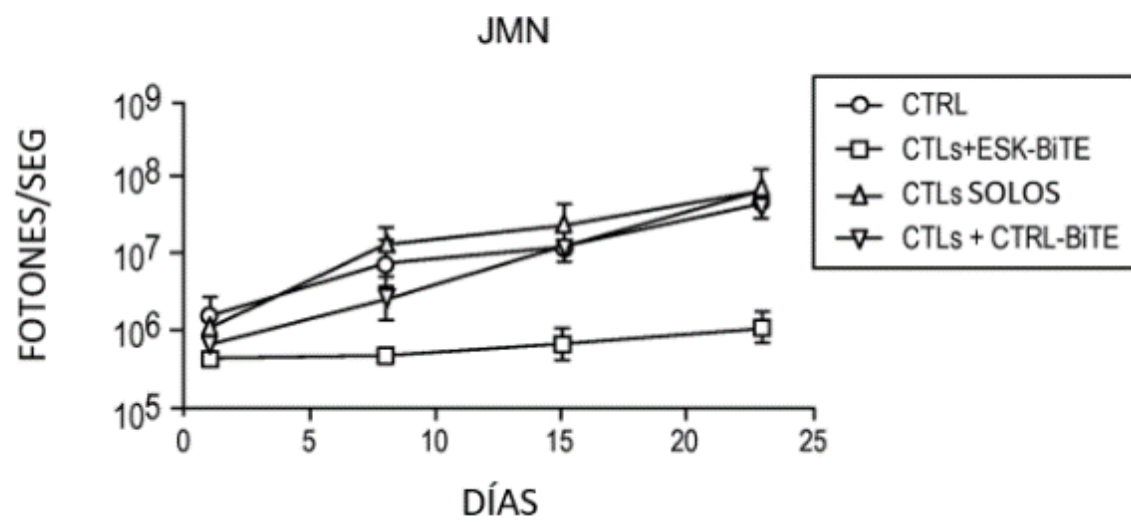


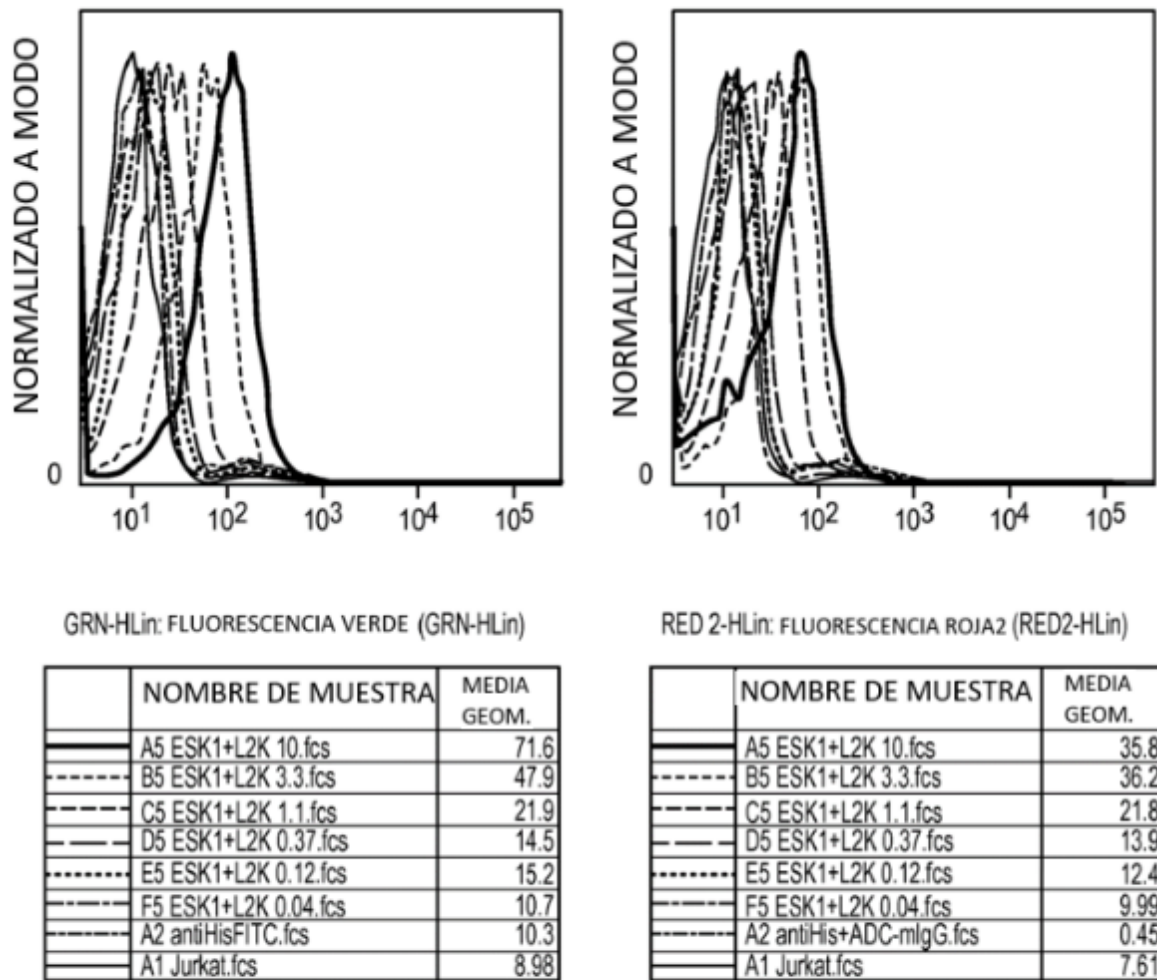
# **FIGURA 6C**





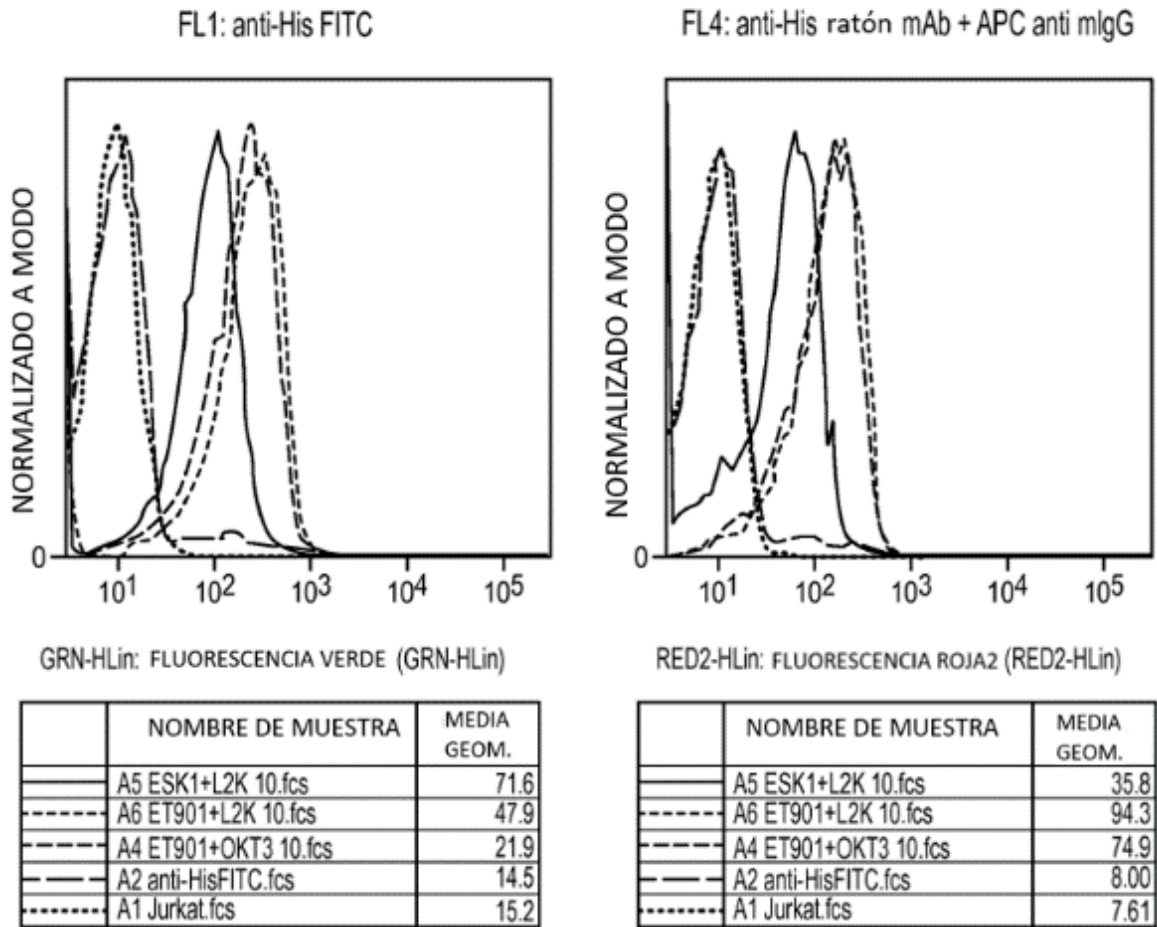
**FIGURA 7A**

**FIGURA 7B**



**FIGURA 8**

**FIGURA 9**





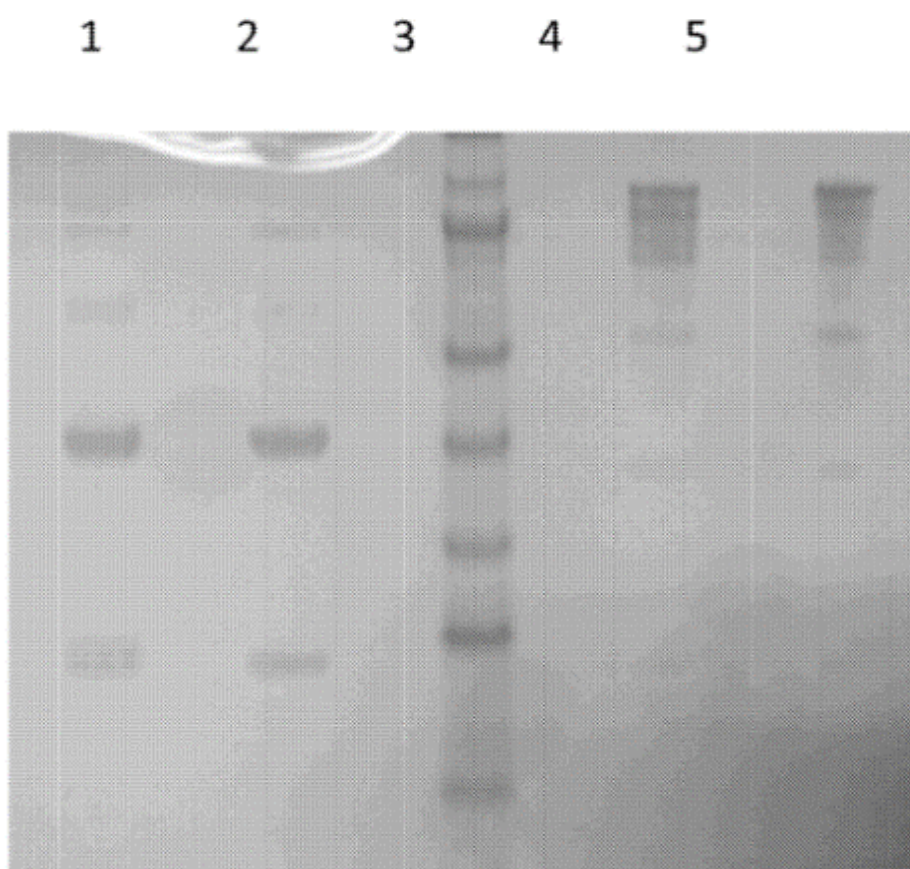
## FIGURA 10

### SECUENCIA ESK1-T BiTE AA

MGWSCIIILFLVATATGQAVVTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQ  
 QVPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAW  
 DDSLNGWVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAQMQLVQSGAE  
 VKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYSYSTYSPS  
 FQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYICARVQYSGYYDWFDPWGQG  
 TLVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQA  
 PGQGLEWIGYINPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYC  
 ARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGGSGGADDDIVLTQSPATLS  
 LSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSG  
 SGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKHHHHHH\*\*

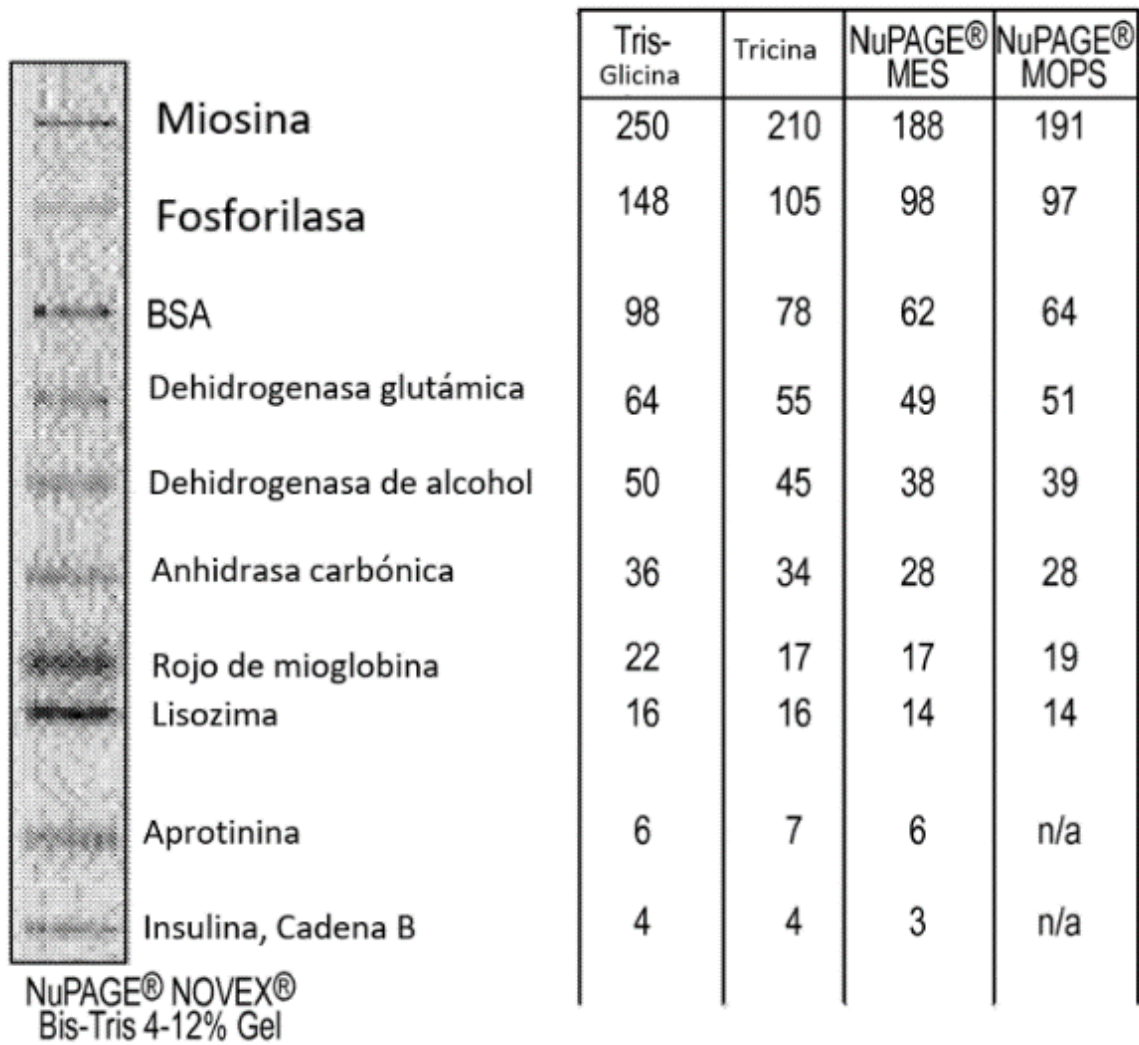
Péptido señal Región variable de cadena ligera enlazador1 Región variable  
 de cadena pesada ESK1 enlazador2 Región variable de cadena pesada L2K  
 enlazador3 Región variable de cadena ligera L2K Etiqueta His

**FIGURA 11A**



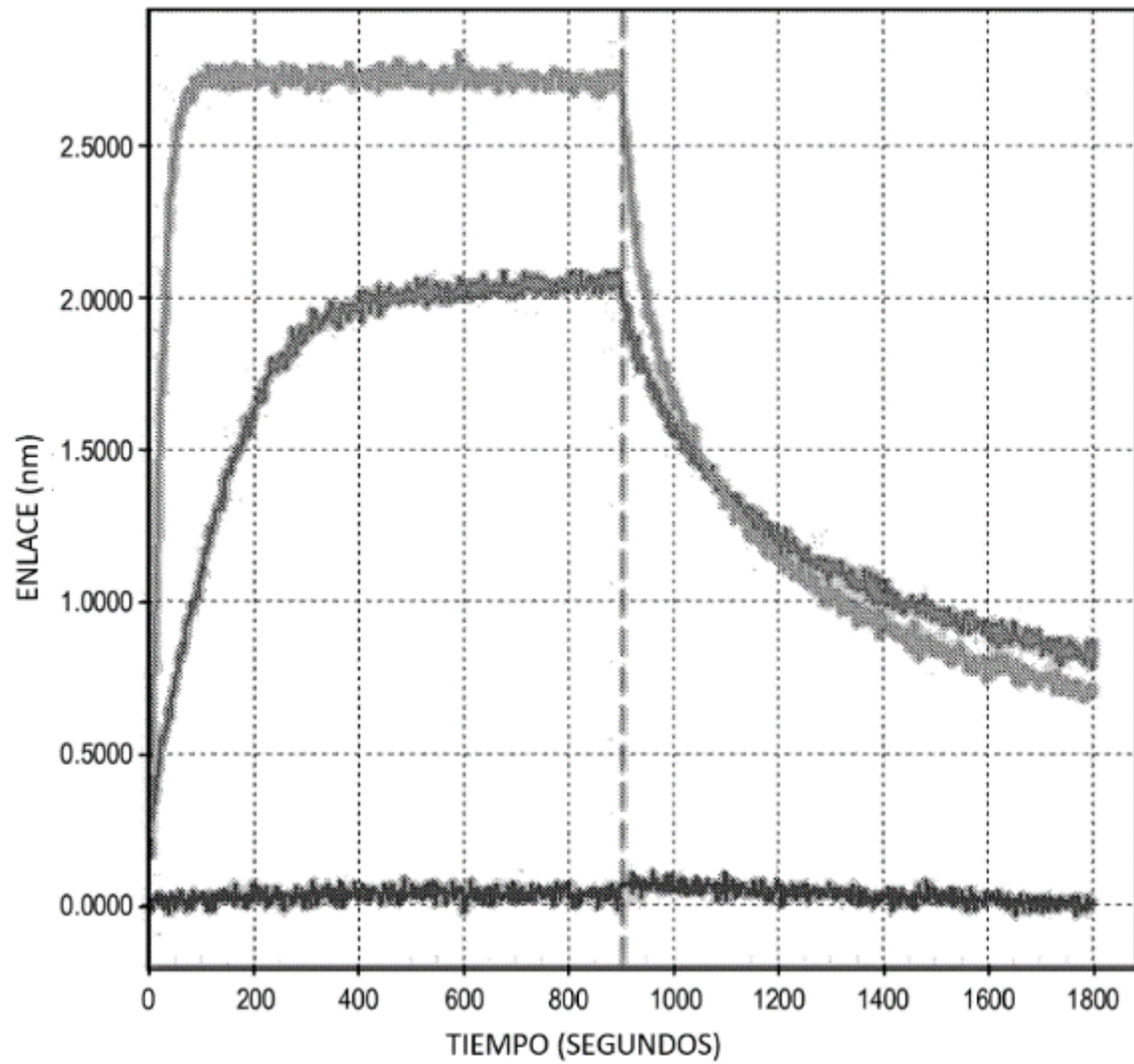
Carriles:

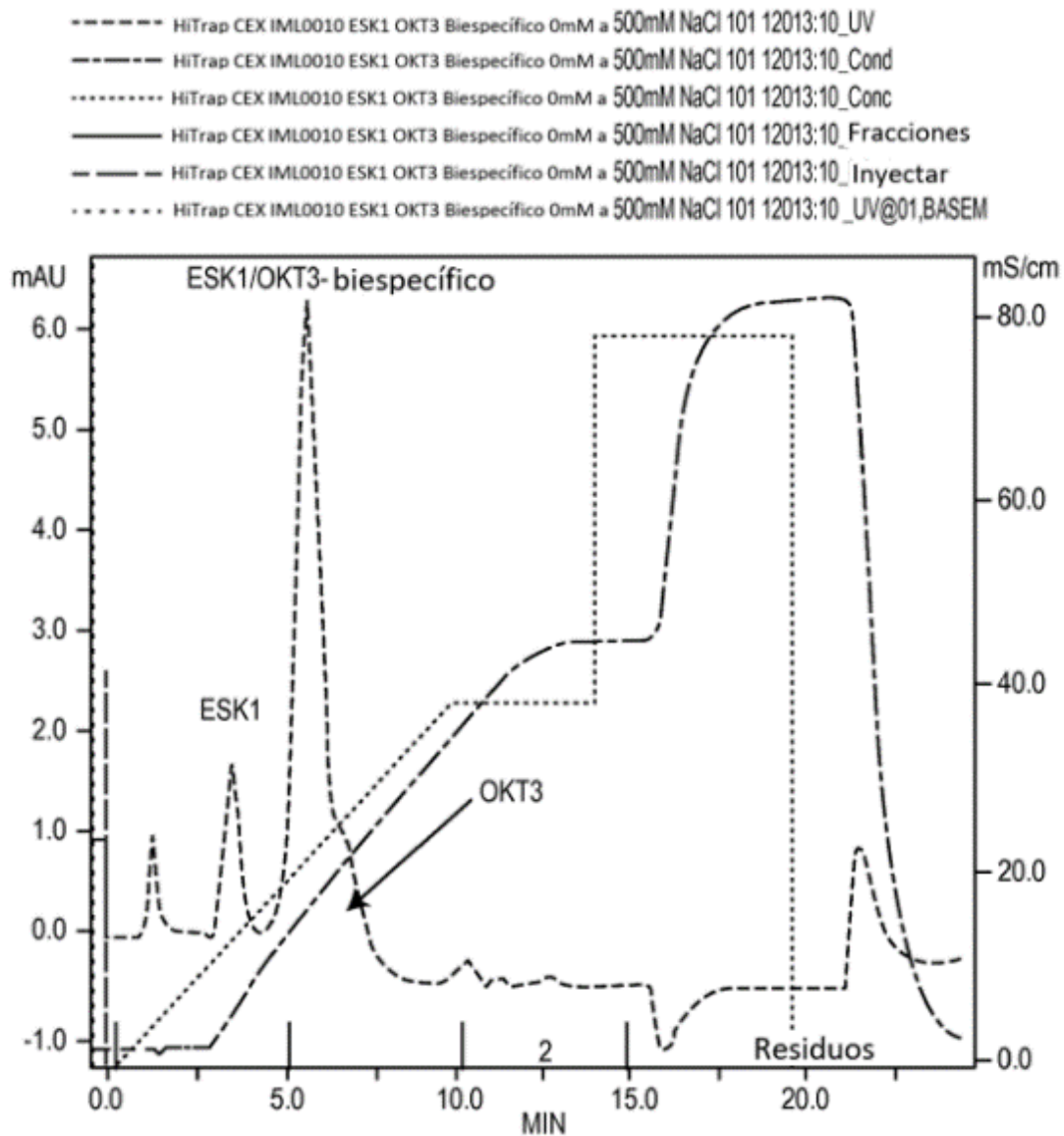
1. ESK1/OKT3 (2  $\mu$ g, Reducido)
2. 901/OKT3 (2  $\mu$ g, Reducido)
3. SeeBlue Plus Pre-Teñido Estándar
4. ESK1/OKT3 (2  $\mu$ g, No Reducido)
5. 901/OKT3 (2  $\mu$ g, No Reducido)

**FIGURA 11B**

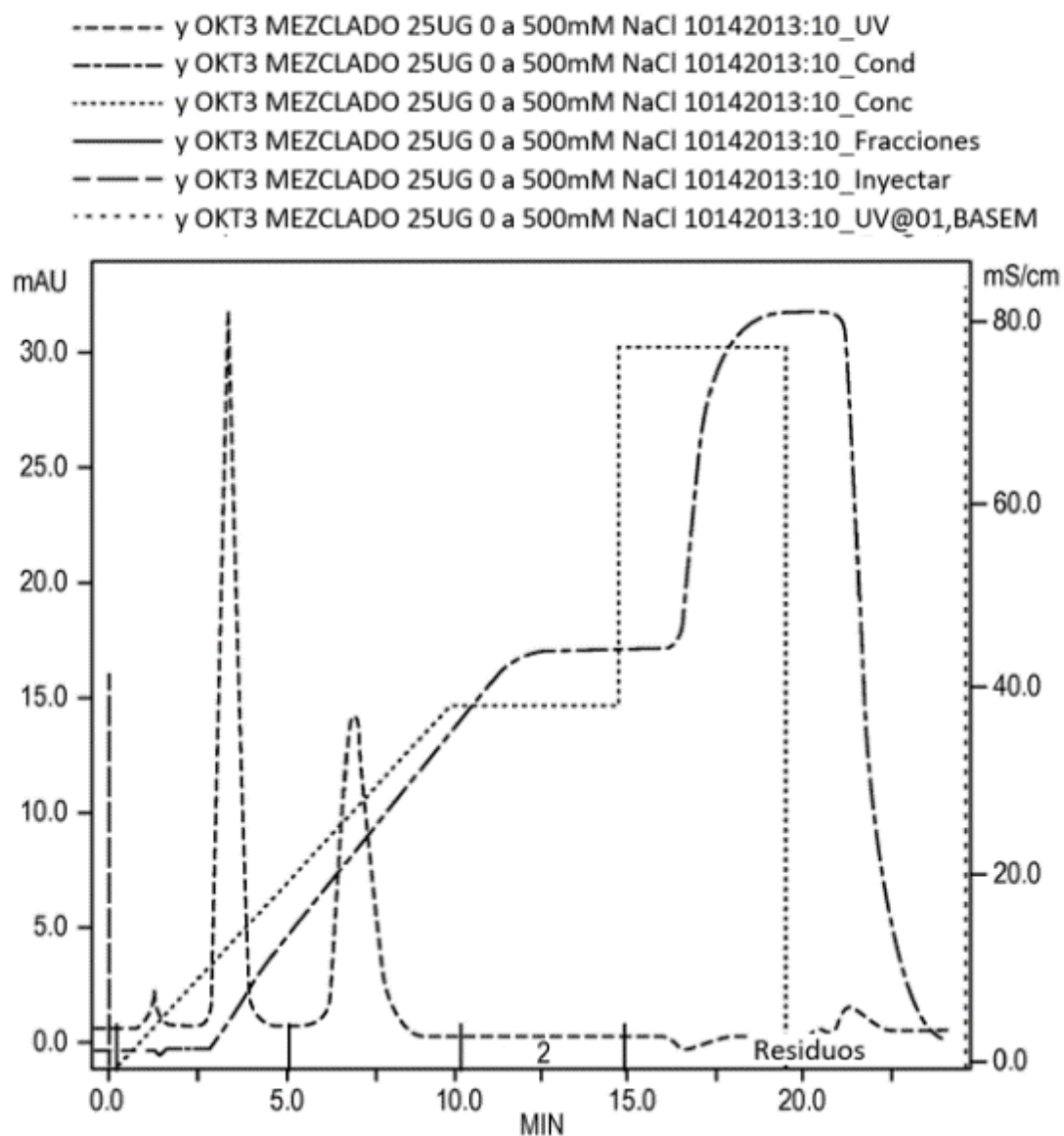


**FIGURA 12**

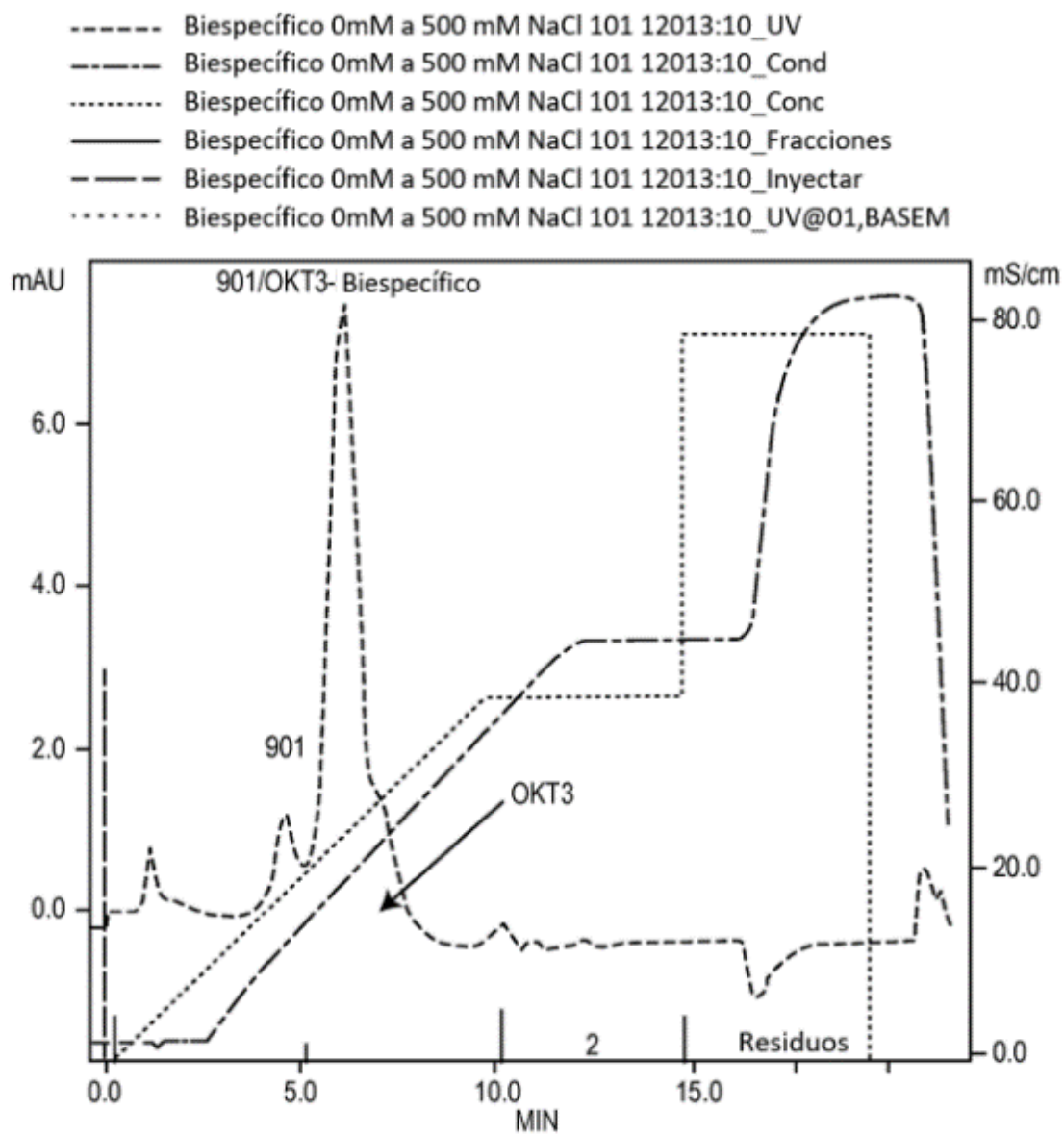


**FIGURA 13A**

	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**

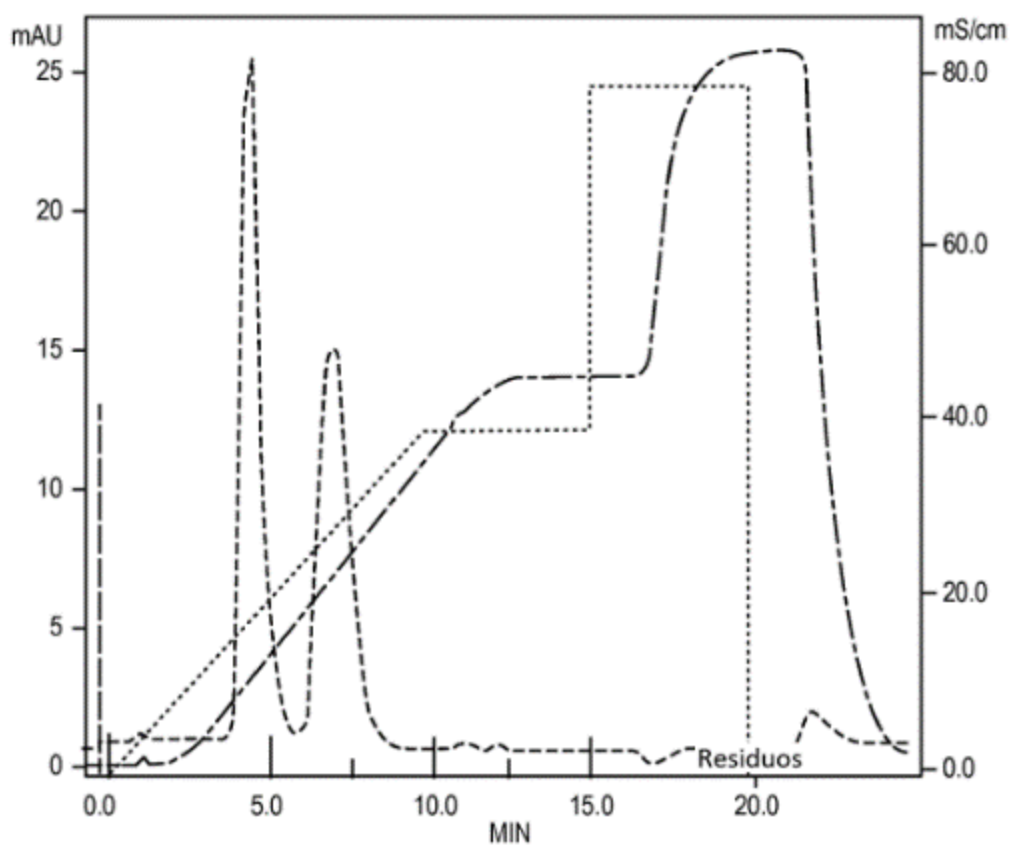
	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA (m/AU)
ESK1	3.35	17.3	31.5
OKT3	7.04	13.8	13.9

**FIGURA 14A**

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

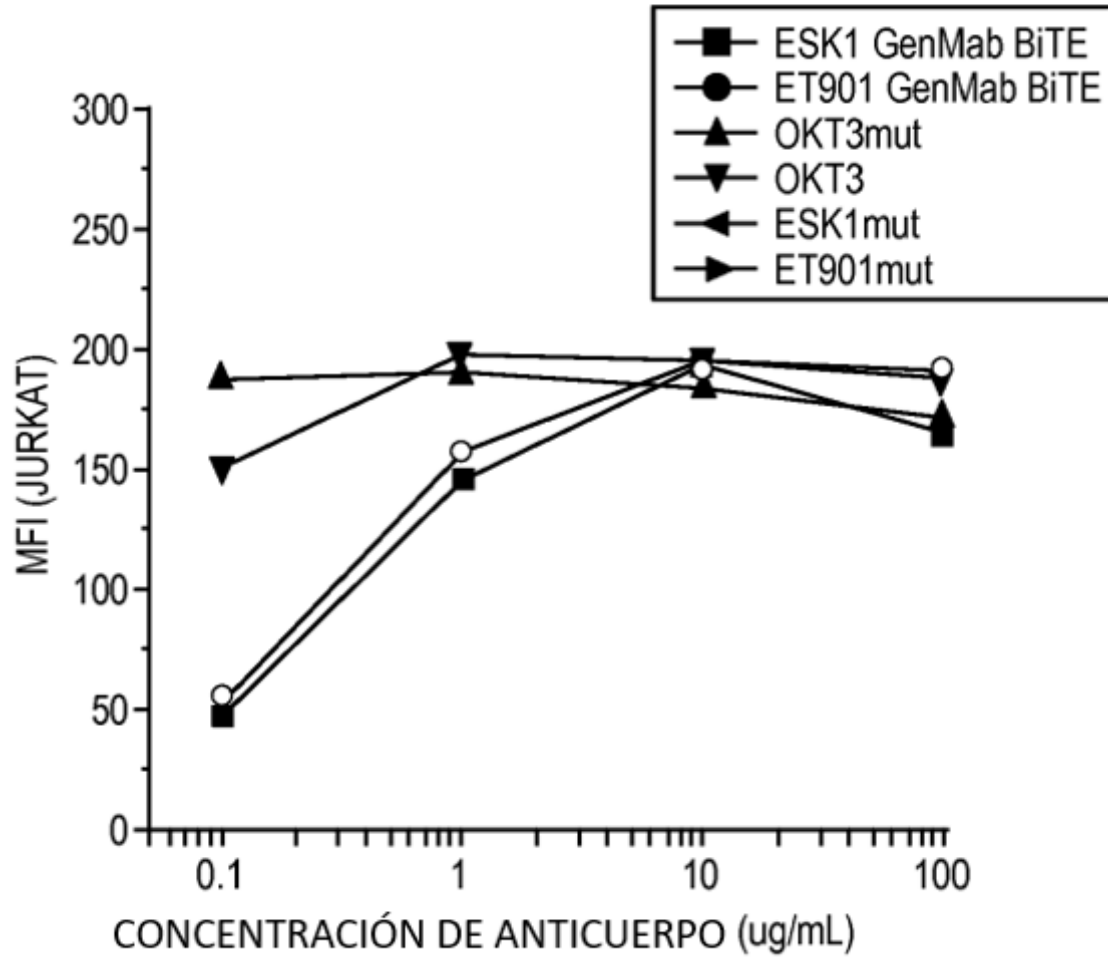
**FIGURA 14B**

----- 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

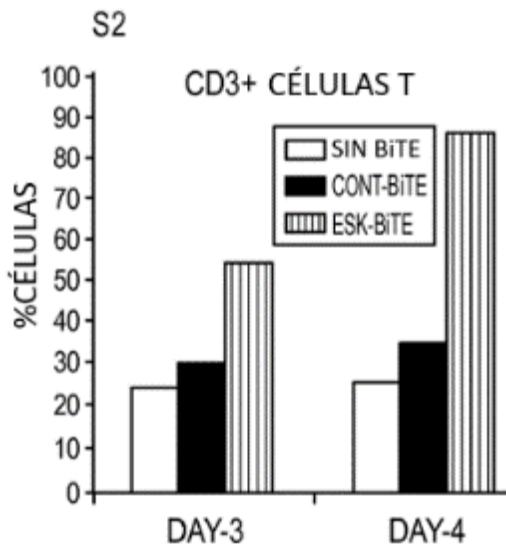


	RETENCIÓN (mL)	ÁREA (AU*mL)	ALTURA (mAU)
901	4.59	16.9	26.5
OKT3	7.07	15.8	15.5

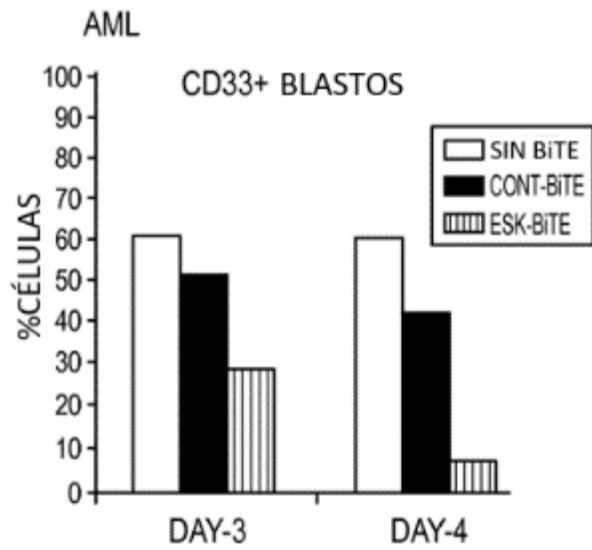
**FIGURA 15**



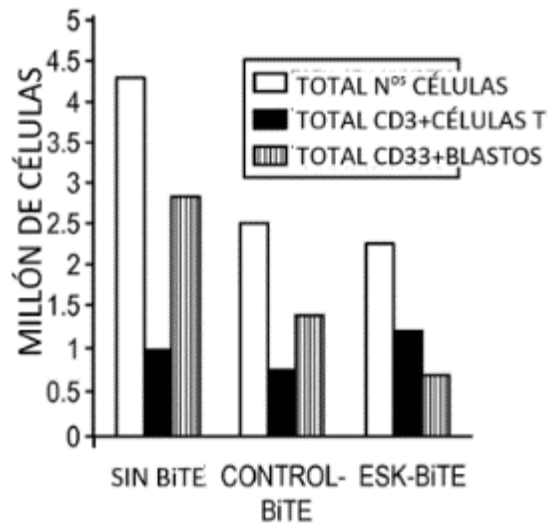
**FIGURA 16A**



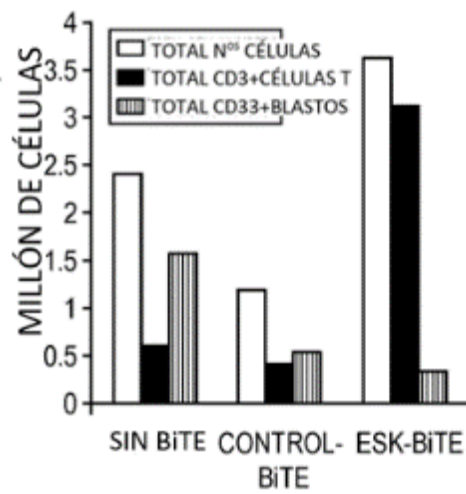
**FIGURA 16B**

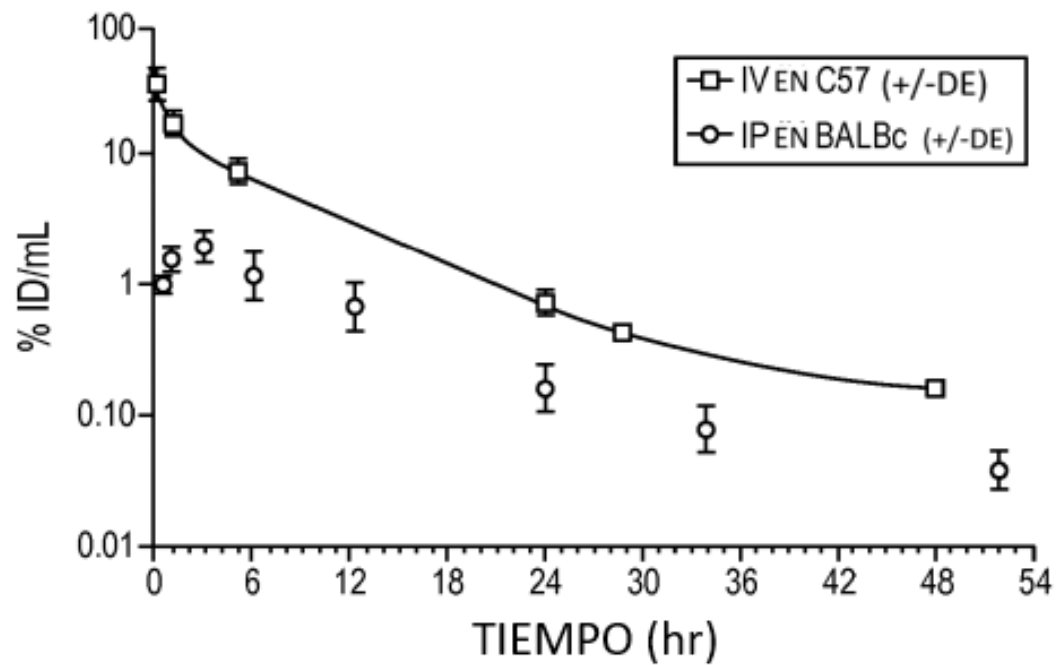
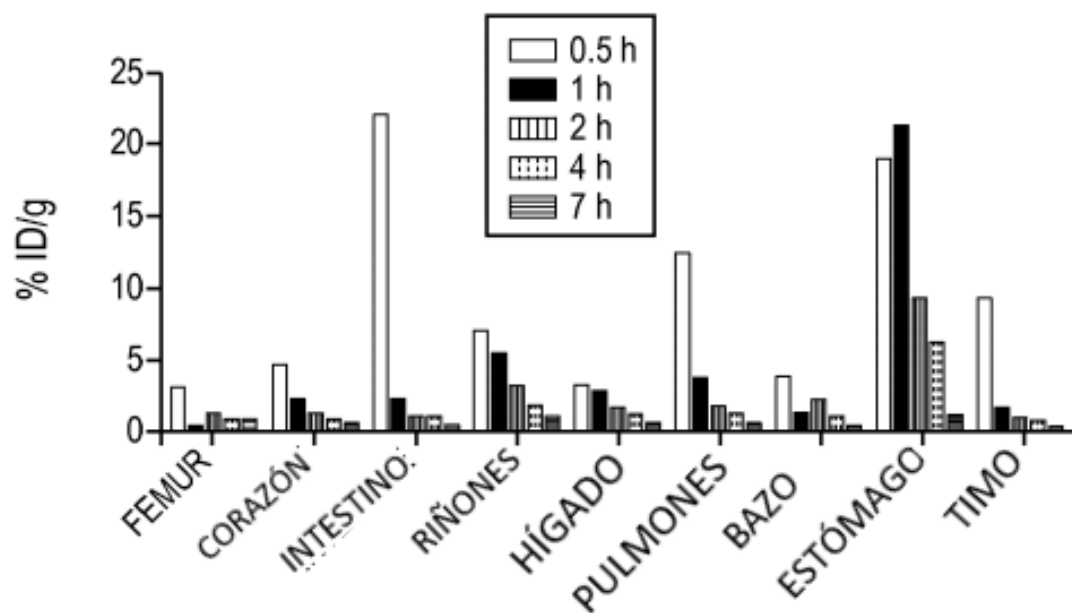


**FIGURA 16C**



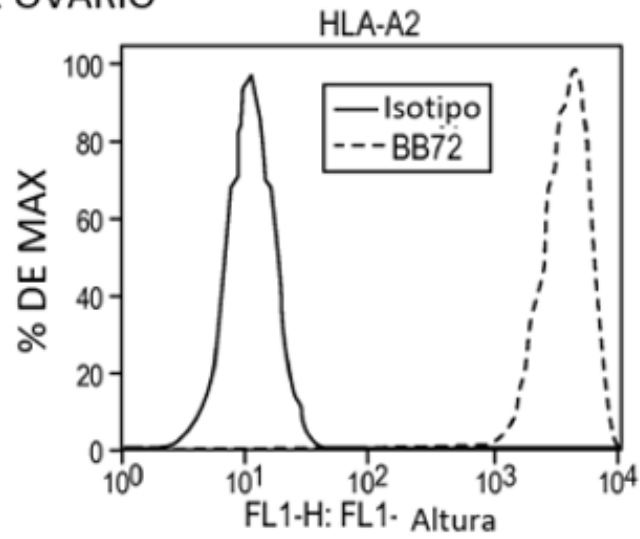
**FIGURA 16D**



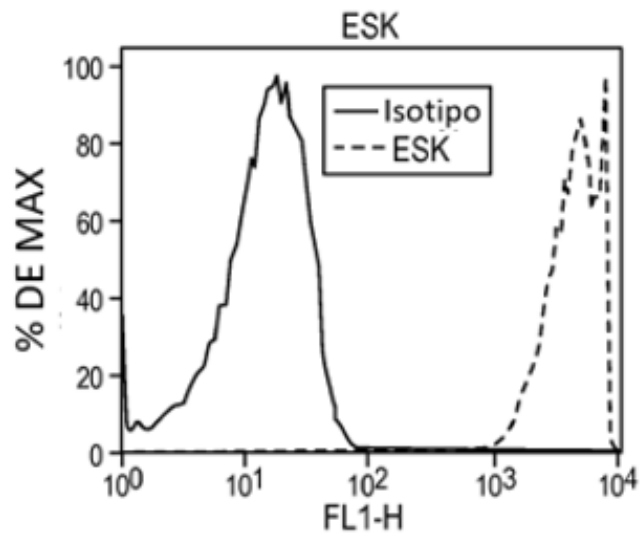
**FIGURA 17A****FIGURA 17B**



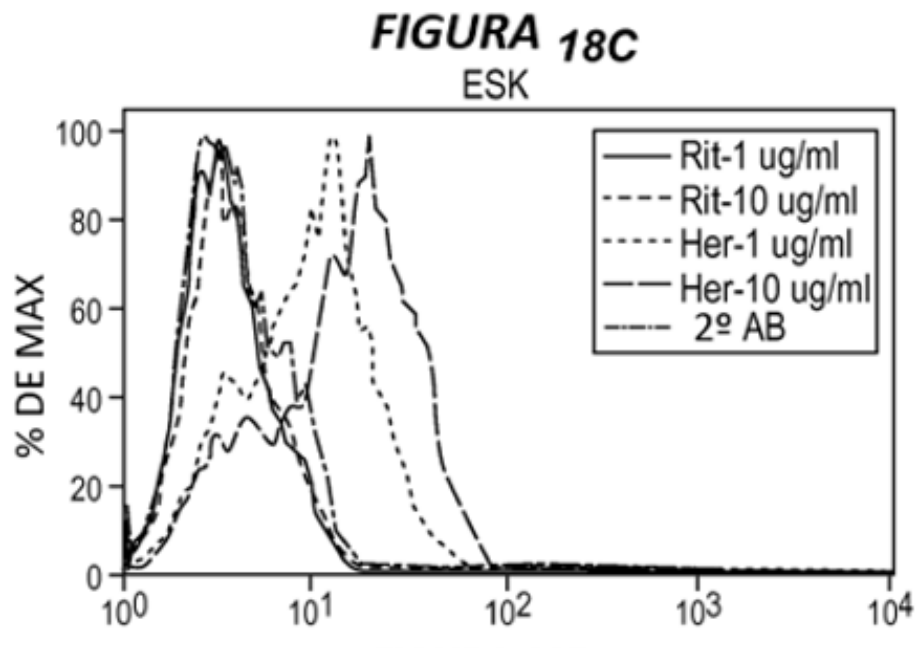
CÁNCER DE OVARIO



**FIGURA 18A**

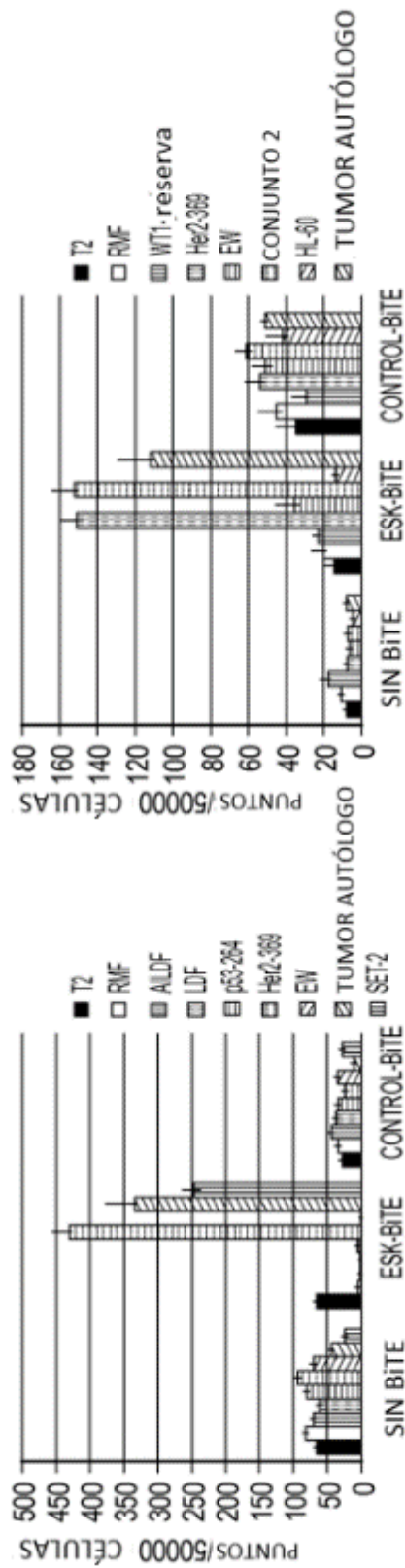


**FIGURA 18B**

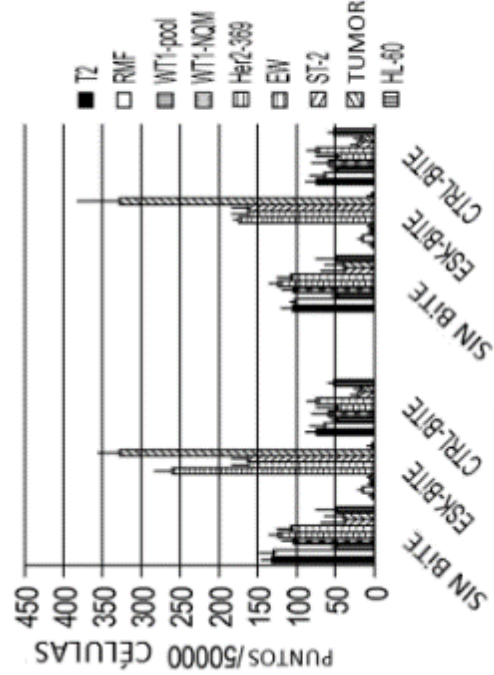


**FIGURA 18C**

**FIGURA 19A**

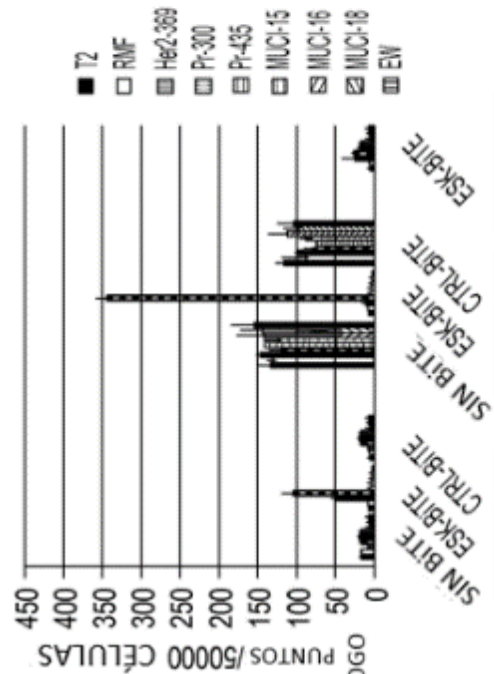


**FIGURA 19C**



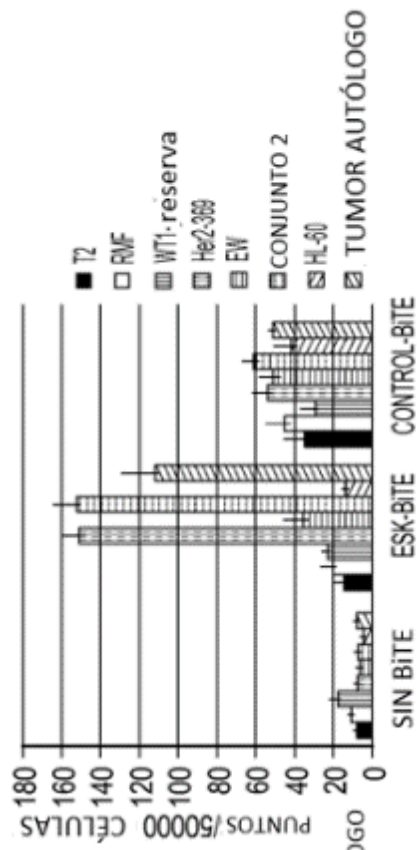
CÉLULAS T CÉLULAS T + B

**FIGURA 19D**



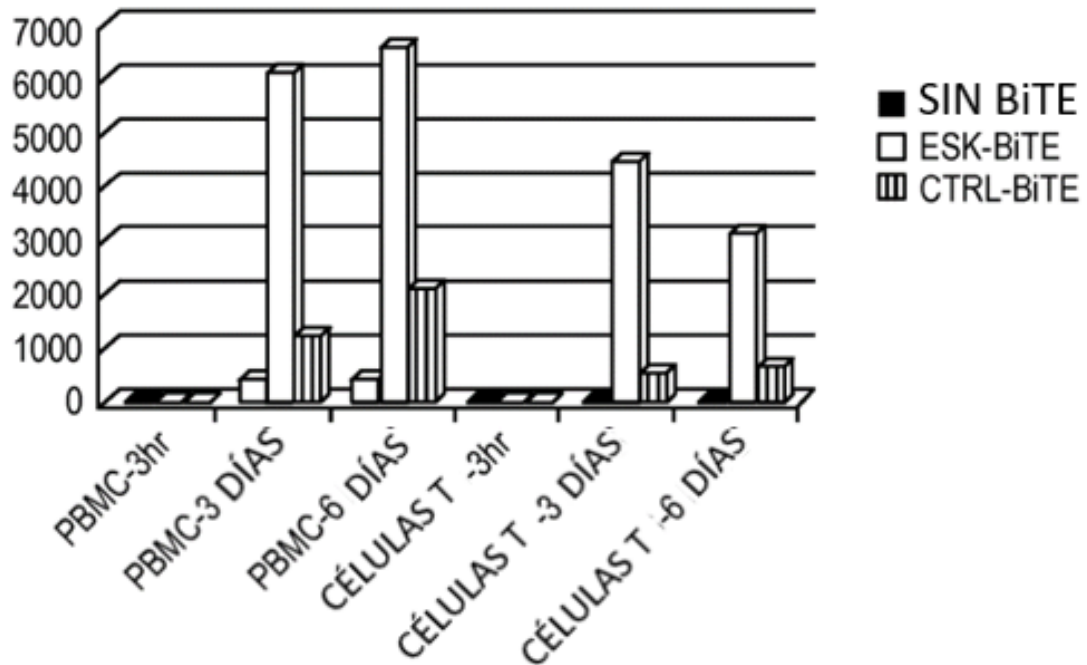
PBMC CÉLULAS T CÉLULAS T + TUMOR MUERTO

**FIGURA 19B**



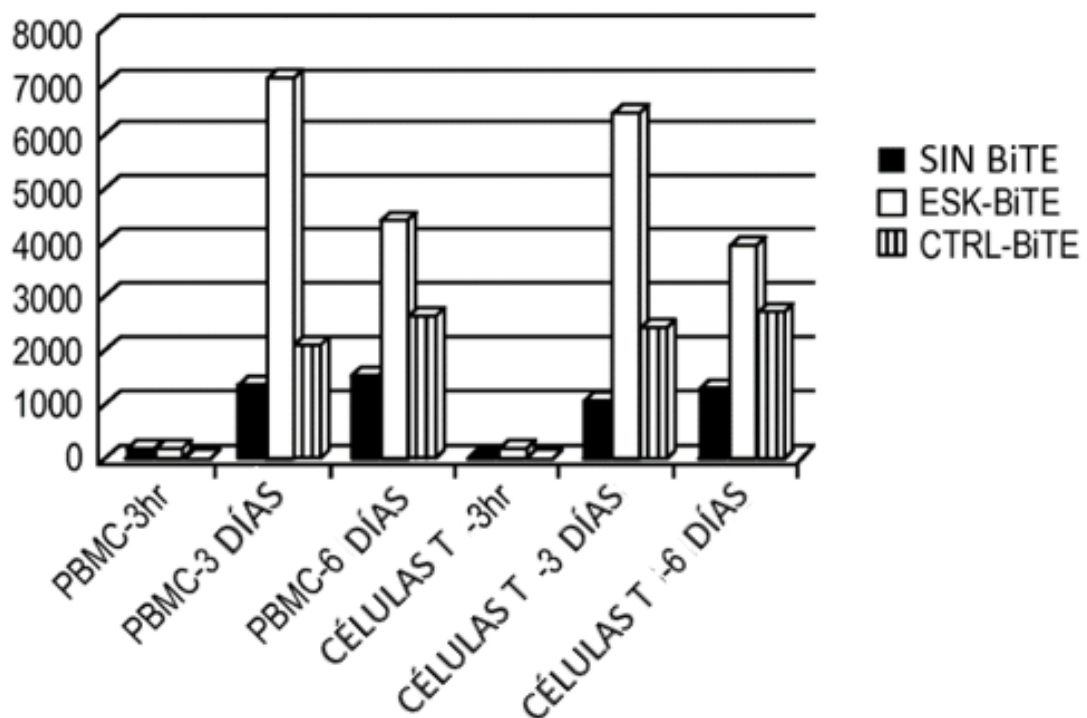
**FIGURA 19E**

LIBERACIÓN IFN-GAMMA



**FIGURA 19F**

LIBERACIÓN IFN-ALFA



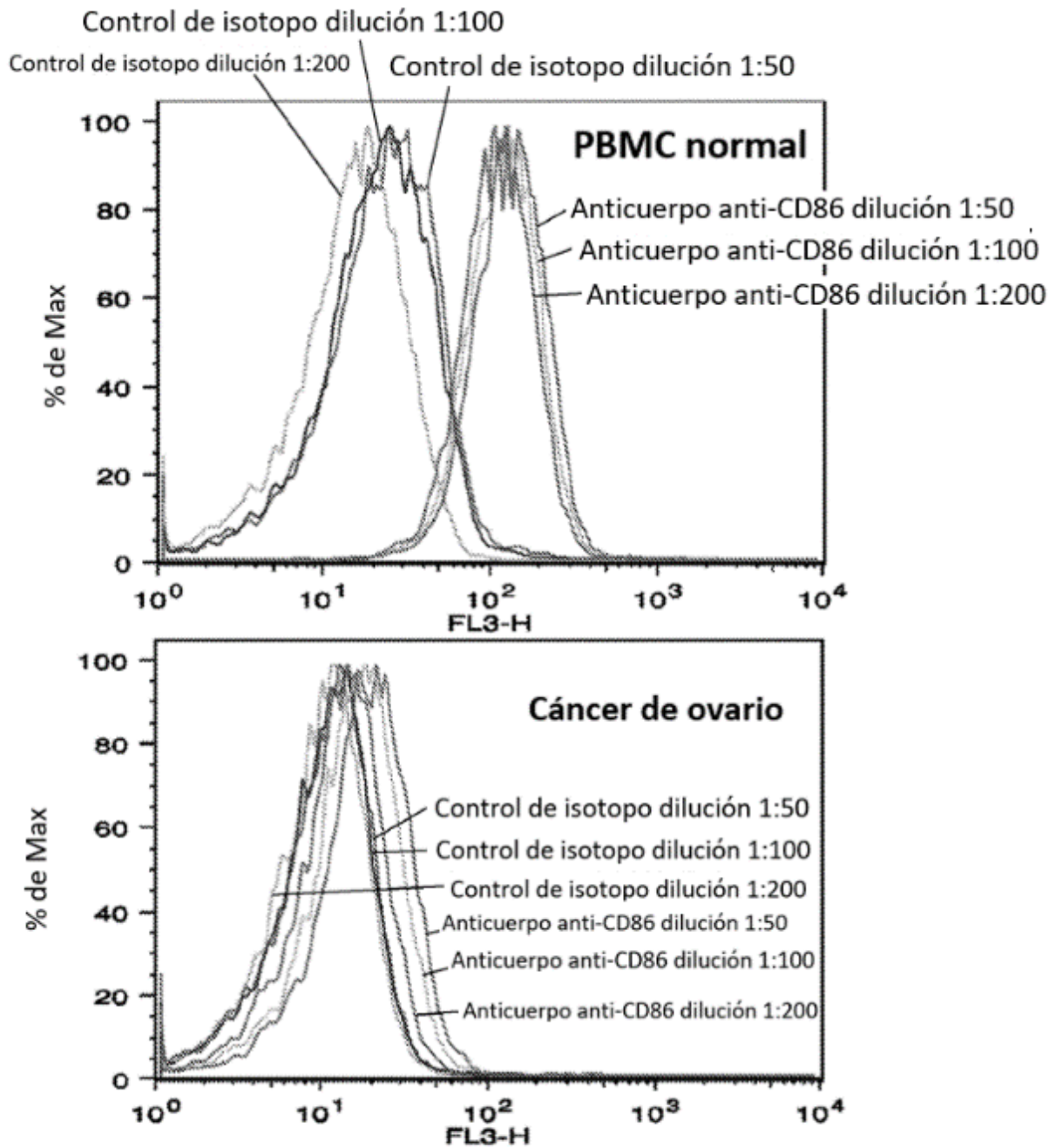
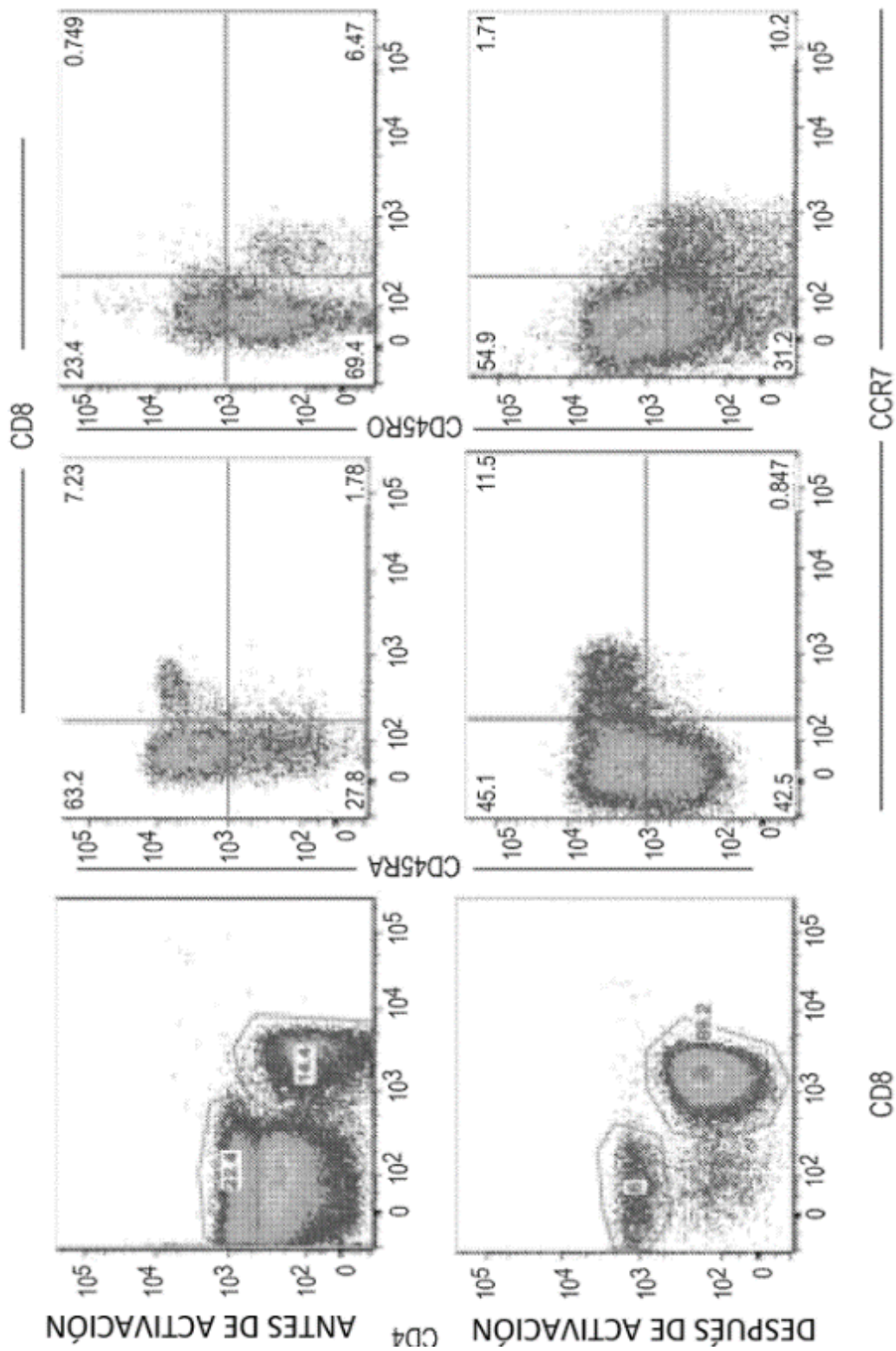
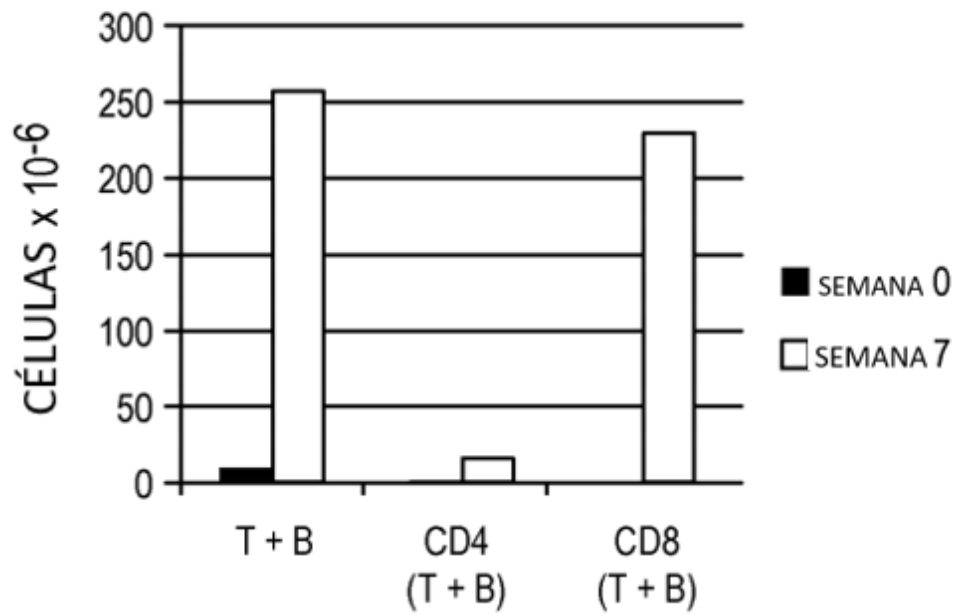


FIGURA 20



**FIGURA 21A**

**FIGURA 21B**



**FIGURA 21C**

