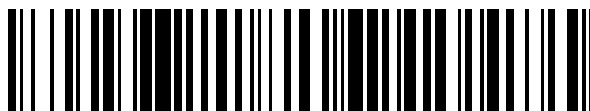


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 904 593**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2017 PCT/IB2017/050109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017 WO17125831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2017 E 17700749 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.10.2021 EP 3405490**

54 Título: **Anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos para la variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico y CD3 y sus usos**

30 Prioridad:

21.01.2016 US 201662281543 P

08.12.2016 US 201662431766 P

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

05.04.2022

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**CHOU, JOYCE CHING;
WONG, OI KWAN y
SASU, BARBRA JOHNSON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 904 593 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 monoespecíficos y biespecíficos para la variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico y CD3 y sus usos

5

Campo

La presente invención se refiere a anticuerpos, p. ej., anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que se unen específicamente a la Variante III del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFRvIII). La invención se refiere, además, a anticuerpos heteromultiméricos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), conjugados de anticuerpos (p. ej., conjugados de anticuerpo-fármaco), a composiciones que comprenden los anticuerpos EGFRvIII y a métodos para producir y purificar anticuerpos de este tipo. También se proporcionan sus usos en diagnóstico y terapéutica.

15 Antecedentes

La variante III de EGFR (EGFRvIII), un mutante específico para tumores del EGFR, es un producto de la transposición genómica que a menudo se asocia con la amplificación del gen EGFR de tipo salvaje. EGFRvIII está formada por una delección en marco de los exones 2-7, lo que conduce a la delección de 267 aminoácidos con una sustitución de glicina en la unión. El receptor truncado pierde su capacidad para unirse a ligandos, pero adquiere actividad quinasa constitutiva. Curiosamente, EGFRvIII con frecuencia se co-expresa con EGFR de tipo salvaje de longitud completa en las mismas células tumorales. Además de ello, las células que expresan EGFRvIII exhiben un aumento de la proliferación, invasión, angiogénesis y resistencia a la apoptosis.

25 EGFRvIII se encuentra con mayor frecuencia en el glioblastoma multiforme (GBM). Se estima que el 25-35% de GBM porta este receptor truncado. Además, su expresión refleja a menudo un fenotipo más agresivo y un pronóstico deficiente. Además del GBM, la expresión de EGFRvIII también se ha reseñado en otros tumores sólidos, tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer de próstata. Por el contrario, EGFRvIII no se expresa en tejidos sanos. La falta de expresión en tejidos normales hace que EGFRvIII sea un objetivo ideal para desarrollar una terapia fijada como objetivo específico para tumores. Hasta la fecha, no ha habido ningún anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA (p. ej., mono-específico o biespecífico) contra EGFRvIII identificado con alta afinidad, alta especificidad y alta potencia en el tratamiento de cánceres tales como el GBM. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos (p. ej., mono-específicos o biespecíficos) para tratar cánceres tales como GBM con un perfil de eficacia y seguridad mejorado, y que sean adecuados para uso con pacientes humanos.

El documento WO2013/185010 A1 describe moléculas que se acoplan a anticuerpos biespecíficos que tienen un brazo que se acopla específicamente a una célula tumoral que expresa la proteína mutante EGFRvIII humana en su superficie, y un segundo brazo que se acopla específicamente al ligando de activación de células T CD3.

40

Sumario

En un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII de acuerdo con la reivindicación 1. La reivindicación 1 se refiere a anticuerpos que comprenden las CDRs de los clones de anticuerpos enumerados en la Tabla 8A y la Tabla 8B.

45

La invención descrita en esta memoria está dirigida a anticuerpos (p. ej., anticuerpos mono-específicos o biespecíficos) y conjugados de anticuerpos que se unen específicamente a la variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII).

50

La presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFRvIII, en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 143, 144 o 145; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 105, 106, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 135, 136, 140, 141, 146, 147, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235 o 237; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 67, 72, 73, 79, 85, 104, 107, 108, 114, 120, 126, 129, 142, 148, 219, 220, 221, 222, 223 o 236; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 149, 154, 156, 159, 162, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 176, 178, 181, 182, 185, 187, 190, 192, 195, 198, 238 o 239; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 150, 152, 155, 157, 160, 163, 172, 175, 179, 183, 186, 188, 191, 193, 196 o 199; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 151, 153, 158, 161, 164, 167, 177, 180, 184, 189, 194, 197 o 200.

60

65

También se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFRvIII, en donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217 o 218; y/o una región VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 211, 212, 213 o 215. En algunas realizaciones, la región VH como se describe en esta memoria comprende una variante con una o varias sustituciones de aminoácidos conservativas en residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL como se describe en esta memoria comprende una variante con una o varias sustituciones de aminoácidos en aminoácidos que no están dentro de una CDR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región VH o VL puede comprender una secuencia de aminoácidos arriba descrita o una variante de la misma con no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones conservadoras en residuos que no están dentro de una CDR.

Se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFRvIII, en donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, 9, 11, 15, 30, 37 o 41; y/o una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6, 10, 12, 16, 31, 38 o 42. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 37 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 41 y la región VL comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana (p. ej., EGFRvIII) y que comprende un segundo dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector (p. ej., grupo de diferenciación 3 (CD3)) localizado en la célula efectora inmunitaria humana. En algunos ejemplos, el primer dominio variable de anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217 o 218; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 211, 212, 213 o 215. En algunos ejemplos, el primer dominio variable de anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad (CDR1) de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 143, 144 o 145; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 105, 106, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 135, 136, 140, 141, 146, 147, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235 o 237; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 67, 72, 73, 79, 85, 104, 107, 108, 114, 120, 126, 129, 142, 148, 219, 220, 221, 222, 223 o 236; y/o (b) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 149, 154, 156, 159, 162, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 176, 178, 181, 182, 185, 187, 190, 192, 195, 198, 238 o 239; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 150, 152, 155, 157, 160, 163, 172, 175, 179, 183, 186, 188, 191, 193, 196 o 199; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 151, 153, 158, 161, 164, 167, 177, 180, 184, 189, 194, 197 o 200.

En algunas realizaciones, el segundo dominio variable de anticuerpo comprende la región VH y/o VL específica contra CD3. Por ejemplo, el segundo dominio variable de anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 240; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 241. En algunas realizaciones, el segundo dominio variable de anticuerpo comprende (a) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 244, 110 o 245; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 246 o 247; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 248; y/o una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 249; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 250; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 251.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria comprenden una región constante. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria son de la subclase IgG1, IgG2 o IgG2a, IgG3 o IgG4

humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria comprenden una región constante glicosilada. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria comprenden una región constante que tiene una afinidad de unión disminuida a uno o más receptores Fc-gamma humanos.

5 En algunas realizaciones, tanto el primer como el segundo dominios variables de anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225 y 228 (p. ej., C223E o C223R), (E225R) y (P228E o P228R)) en la región de bisagra y en la posición 409 o 368 (p. ej., K409R o L368E (esquema de numeración de la UE)) en la región CH3 de la IgG2 humana (SEQ ID NO: 290).

10 En algunas realizaciones, tanto el primer como el segundo dominios variables de anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en la posición 265 (p. ej., D265A) de la IgG2 humana.

En algunas realizaciones, tanto el primer como el segundo dominios variables de anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 265 (p. ej., D265A), 330 (p. ej., A330S) y 331 (p. ej., P331S) de la IgG2 humana. En algunas realizaciones, tanto el primer como el segundo dominios variables de anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en cada una de las posiciones 265 (p. ej., D265A), 330 (p. ej., A330S) y 331 (p. ej., P331S) de la IgG2 humana.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende una etiqueta que contiene glutamina de un donante de acilo modificada en un sitio específico del anticuerpo EGFRvIII de la presente invención.

En una variación, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende una etiqueta que contiene glutamina de un donante de acilo y una modificación de aminoácidos en la posición 222, 340 o 370 del anticuerpo EGFRvIII de la presente invención. En algunas realizaciones, la modificación de aminoácidos es una sustitución de lisina por arginina.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo EGFRvIII de la presente invención comprende además un enlazador.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo EGFRvIII como se describe en esta memoria, en donde el anticuerpo se conjuga con un agente, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente formador de imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero y un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el agente es un agente citotóxico que incluye, pero no se limita a una antraciclina, una auristatina, una camptotecina, una combretastatina, una dolastatina, una duocarmicina, una enediina, una geldanamicina, un dímero de indolino-benzodiazepina, una maitansina, una puomicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina, un taxano, un alcaloide de la vinca, una tubulisina, una hemisterlina, una espliceostatina, un pladienólido y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos. Por ejemplo, el agente citotóxico es MMAD (Monometil Auristatina D), 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-1-(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 3377 (N,2-dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida), 0131 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) o 0121 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida).

45 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un conjugado que comprende la fórmula: anticuerpo-(etiqueta que contiene glutamina de donante de acilo)-(enlazador)-(agente citotóxico).

50 En otras realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpos de la invención.

La invención también proporciona líneas celulares que producen de forma recombinante cualquiera de los anticuerpos de la invención.

55 La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos de la invención. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos de la invención.

60 La invención también proporciona kits que comprenden una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpos de la invención.

La invención también proporciona los anticuerpos aislados, anticuerpos biespecíficos o conjugados de anticuerpos de la invención para uso en métodos de tratamiento de sujetos que lo necesiten, en donde los métodos comprenden administrar dichos anticuerpos a dicho sujeto.

65

También se proporcionan los anticuerpos de la invención para uso en métodos de tratamiento de una afección asociada con células malignas que expresan EGFRvIII en un sujeto, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos o conjugados de anticuerpos tal como se describe en esta memoria. En algunas realizaciones, la afección es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer relacionado con EGFRvIII (p. ej., cualquier cáncer con expresión de EGFRvIII) seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligastrocitoma anaplásico, carcinoma del plexo coroideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, pineocitoma, meningioma, meduloepitelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supraentorial, tumor teratoide/rabdoide atípico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer gástrico, cáncer de tiroides, mesotelioma, cáncer de útero y cáncer de vejiga.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos de la invención para uso en un método de inhibir el crecimiento o la progresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan EGFRvIII, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos aislados, anticuerpos biespecíficos o conjugados de anticuerpos tal como se describe en esta memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos de la invención para uso en un método de inhibir la metástasis de células malignas que expresan EGFRvIII en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos aislados, anticuerpos biespecíficos o conjugados de anticuerpos tal como se describe en esta memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos de la invención para uso en un método de inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan EGFRvIII, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos aislados, anticuerpos biespecíficos o conjugados de anticuerpos tal como se describe en esta memoria.

Breve Descripción de las Figuras/los Dibujos

Las FIGs. 1A, 1B y 1C muestran ejemplos de histogramas de unión a FACS de tres anticuerpos EGFRvIII: mAb 42G9 (FIG. 1A), 32A10 (FIG. 1B) y 32G8 (FIG. 1C), a las tres líneas celulares F98: F98 (EGFR negativo), F98-EGFRwt y F98-EGFRvIII. El eje X es la intensidad de la fluorescencia; el eje Y es el porcentaje del máximo / normalizado al modo.

Las FIGs. 2A, 2B y 2C representan histogramas que muestran la expresión de EGFR de tipo salvaje y EGFRvIII en líneas celulares GBM medidas por citometría de flujo: LN229-EGFRvIII (FIG. 2A), LN18-EGFRvIII (FIG. 2B) y DKMG (FIG. 2C). Se detectó EGFRvIII con mAb 42G9 y EGFRwt se detectó con un mAb específico de tipo salvaje para EGFR. El eje X es la intensidad de la fluorescencia; el eje Y es el porcentaje del máximo / normalizado al modo.

Las FIGs. 3A y 3B muestran gráficos que demuestran la citotoxicidad de tres anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 en células LN18-EGFRvIII transducidas con EGFRvIII (FIG. 3A) y LN18 parentales (FIG. 3B).

Las FIGs. 4A y 4B muestran gráficos que demuestran la citotoxicidad de tres anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 en células LN229-EGFRvIII transducidas con EGFRvIII (FIG. 4A) y LN229 parentales (FIG. 4B).

La FIG. 5 muestra un gráfico que demuestra la citotoxicidad de tres anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 en células DKMG, que expresan proteínas endógenas EGFRvIII y EGFR de tipo salvaje.

La FIG. 6 muestra un gráfico que ilustra la actividad antitumoral *in vivo* de anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 en un modelo subcutáneo de la línea celular LN229-EGFRvIII de GBM.

Descripción Detallada

La invención descrita en esta memoria proporciona anticuerpos (p. ej., mono-específicos o biespecíficos) y conjugados de anticuerpos que se unen específicamente a EGFRvIII (p. ej., EGFRvIII humano). La invención también proporciona polinucleótidos que codifican estos anticuerpos, composiciones que comprenden estos anticuerpos y conjugados de anticuerpos, y métodos para producir y utilizar estos anticuerpos y conjugados de anticuerpos. La presente divulgación también proporciona métodos para tratar una afección asociada con patologías mediadas por EGFRvIII en un sujeto, tal como el cáncer.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, inmunología, virología, generación e ingeniería de anticuerpos monoclonales, que se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica. Técnicas de este tipo se explican completamente en la bibliografía, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en esta memoria, el término abarca no solo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también fragmentos de unión a antígenos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) y de dominio (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido) y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conserva la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (p. ej., EGFRvIII). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen Fab; Fab'; F(ab')₂; 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 de anticuerpo de dominio sencillo (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

Un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo o un polipéptido que "se une preferentemente" o "se une específicamente" (utilizado indistintamente en esta memoria) a una diana (p. ej., proteína EGFRvIII) es un término bien entendido en la técnica, y métodos para determinar una unión específica o preferente también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula exhibe "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítipo EGFRvIII es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítopos EGFRvIII o epítopos no EGFRvIII. También se entiende que al leer esta definición, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o la "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDRs de cada una de las cadenas se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FRs y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos

técnicas para determinar las CDRs: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Tal como se utiliza en esta memoria, una CDR puede referirse a las CDRs definidas por cualquier enfoque o por una combinación de ambos enfoques.

Una "CDR" de un dominio variable son residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación tanto de Kabat como de Chothia, AbM, contacto y/o definiciones conformacionales o cualquier método. de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Las CDRs de anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat et al. Véase, p. ej., Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDRs también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Véase, p. ej., Chothia et al., *Nature* 342:877-883, 1989. Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la "definición de AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva utilizando el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de las CDRs basada en los contactos de antígenos observados, recogida en MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745, 1996. En otro enfoque, denominado en esta memoria "definición conformacional" de las CDRs, las posiciones de las CDRs pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Véase, p. ej., Makabe et al., *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008. Todavía otras definiciones de límites de la CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero no obstante se superpondrán con al menos una parte de las CDRs de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la vista de la predicción o los hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso las CDRs completas no tienen un impacto significativo en la unión del antígeno. Tal como se utiliza en esta memoria, una CDR puede referirse a las CDRs definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en esta memoria pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDRs se pueden definir de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto y/o conformacionales.

Tal como se utiliza en esta memoria, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada uno de los anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por método particular alguno. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante tal como se describe en la Pat. de EE. UU. Nº 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de fagotecas generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature* 348:552-554, 1990, por ejemplo.

Tal como se utiliza en esta memoria, anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Preferiblemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco importadas, pero que se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos que tengan regiones Fc modificadas tal como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDRs "derivadas de" una o más CDRs del anticuerpo original.

Tal como se utiliza en esta memoria, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para hacer anticuerpos humanos conocidas por los expertos en la técnica o descritas en esta memoria. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una fagoteca, en que esa fagoteca expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante la inmunización de animales en los que se han introducido transgénicamente loci de inmunoglobulina humana en lugar de los loci endógenos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las Pat. de EE. UU. N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (linfocitos B de este tipo pueden recuperarse de un individuo o de la clonación de células individuales del ADNc, o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, p. ej., Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95, 1991; y Pat. de EE. UU. N° 5.750.373.

La expresión "anticuerpo quimérico" pretende hacer referencia a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud. Por ejemplo, la cadena puede ser relativamente corta (p. ej., 10-100 aminoácidos) o más larga. La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpida por no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que ha sido modificada de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

Un "anticuerpo monovalente" comprende un sitio de unión al antígeno por molécula (p. ej., IgG o Fab). En algunos casos, un anticuerpo monovalente puede tener más de un sitio de unión al antígeno, pero los sitios de unión son de diferentes antígenos.

Un "anticuerpo monoespecífico" comprende dos sitios de unión al antígeno idénticos por molécula (p. ej., IgG), de manera que los dos sitios de unión se unen a un epítipo idéntico en el antígeno. Por lo tanto, compiten entre sí al unirse a una molécula de antígeno. La mayoría de los anticuerpos que se encuentran en la naturaleza son monoespecíficos. En algunos casos, un anticuerpo monoespecífico también puede ser un anticuerpo monovalente (p. ej., Fab).

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno por molécula (p. ej., IgG). En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

Un "biespecífico" o "específico dual" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico se unen a dos epítopos diferentes, que pueden residir en la misma o en diferentes dianas de proteína.

Un anticuerpo "bifuncional" es un anticuerpo que tiene sitios de unión al antígeno idénticos (es decir, secuencias de aminoácidos idénticas) en los dos brazos, pero cada uno de los sitios de unión puede reconocer dos antígenos diferentes.

Un "heteromultímero", "complejo heteromultimérico" o "polipéptido heteromultimérico" es una molécula que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido. El heteromultímero puede comprender un "heterodímero" formado por el primer y segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior en donde están presentes polipéptidos además del primer y segundo polipéptido.

Un "heterodímero", "proteína heterodimérica", "complejo heterodimérico" o "polipéptido heteromultimérico" es una molécula que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido.

5 La "región de bisagra", "secuencia de bisagra" y variaciones de las mismas, tal como se utiliza en esta memoria, incluye el significado conocido en la técnica, que se ilustra, por ejemplo, en Janeway et al., *ImmunoBiology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999); Bloom et al., *Protein Science* (1997), 6:407-415; Humphreys et al., *J. Immunol. Methods* (1997), 209:193-202.

10 La "región de bisagra similar a inmunoglobulina", "secuencia de bisagra similar a inmunoglobulina" y variaciones de las mismas, tal como se utiliza en esta memoria, se refieren a la región de bisagra y a la secuencia de bisagra de una molécula similar a inmunoglobulina o similar a anticuerpo (p. ej., inmunoadhesinas). En algunas realizaciones, la región de bisagra similar a inmunoglobulina puede ser o derivarse de cualquier subtipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de IgA, IgE, IgD o IgM, incluyendo formas quiméricas de las mismas, p. ej., una región de bisagra de IgG1/2
15 quimérica.

La expresión "célula efectora inmunitaria" o "célula efectora", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmunológico humano que puede activarse para afectar a la viabilidad de una célula diana. La viabilidad de una célula diana puede incluir supervivencia celular, proliferación
20 y/o capacidad para interactuar con otras células.

Anticuerpos de la invención se pueden producir utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, p. ej., tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de tecnologías de este tipo u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jayasena, S.D., *Clin. Chem.*, 45: 1628-50, 1999 y Fellouse, F.A., et al, *J. Mol. Biol.*, 373(4):924-40, 2007).
25

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se utiliza indistintamente en esta memoria, se refiere a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato
30 que pueda incorporarse en una cadena mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de nucleótido puede impartirse antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos
35 de modificaciones incluyen, por ejemplo, "casquetes", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de forma natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (p. ej., metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p. ej., fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (p. ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (p. ej., acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (p. ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del o de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse con grupos protectores estándares o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos
40 adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de casquete orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivatizar otros hidroxilos a grupos protectores estándares. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa o beta anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en el que cada uno de los R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en esta memoria, incluyendo ARN y ADN.
55

Como se conoce en la técnica, una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.
60

Tal como se utiliza en esta memoria, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), más preferiblemente, al menos 90% puro, más preferiblemente, al menos 95% puro, aún más preferiblemente, al menos 98% puro, y lo más preferiblemente, al menos 99% puro.
65

Una "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector(es) para la incorporación de inserciones polinucleotídicas. Células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

5 Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con uno o varios polinucleótidos de esta invención.

Como se conoce en la técnica, la expresión "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la

10 cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para que se extienda desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo del mismo. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE como en Kabat. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Tal como se utiliza en la técnica, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas cortadas y empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34, 1994; y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587, 1976; y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249, 1994).

15
20
25

El término "competir", tal como se utiliza en esta memoria con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o un fragmento (o porción) de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo análogo disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo, sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada uno de los anticuerpos inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afín, ya sea en la misma, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" por la unión de su o sus epítopos respectivos. Tanto los anticuerpos que compiten como los que compiten de forma cruzada están abarcados por la presente divulgación. Independientemente del mecanismo por el cual se produzca una competencia o competencia cruzada de este tipo (p. ej., impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común, o parte del mismo), el experto en la materia apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en esta memoria, que quedan abarcados anticuerpos de competencia y/o de competencia cruzada de este tipo y pueden ser útiles para los métodos descritos en esta memoria.

30
35
40

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. "Funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; fagocitosis; regulación a la baja de receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B), etc. Funciones efectoras de este tipo requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (p. ej., un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar funciones efectoras de anticuerpos de este tipo.

45
50

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, pero conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido precursor, p. ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido precursor. La región Fc variante de la presente invención poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido precursor, y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con la misma, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los mismos.

55
60
65

La expresión "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), unión al receptor Fc, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis, unión C1q y regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR). Véase, p. ej., la Pat. de EE. UU. N° 6.737.056. Funciones efectoras de este tipo requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (p. ej., un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar utilizando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar funciones efectoras de anticuerpos de este tipo. Una medida ejemplar de la función efectora es mediante la unión de Fcy3 y/o C1q.

Tal como se utiliza en esta memoria, "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (p. ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen al anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. La actividad de la ADCC de una molécula de interés se puede evaluar utilizando un ensayo de ADCC *in vitro* tal como el descrito en la Patente de EE. UU. N° 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para ensayos de este tipo incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y células NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad de la ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (p. ej., un anticuerpo) que forma un complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, p. ej., tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

Tal como se utiliza en esta memoria, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas o cancerosas, inhibir la metástasis de células neoplásicas, encoger o disminuir el tamaño del tumor que expresa EGFRvIII, remitir una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer), disminuir los síntomas resultantes de una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer), aumentar la calidad de vida de quienes padecen una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer), disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer), retrasar la progresión de una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer), curar una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer) y/o prolongar la supervivencia de pacientes que tienen una enfermedad asociada a EGFRvIII (p. ej., cáncer).

"Mejoramiento" significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con no administrar un anticuerpo EGFRvIII (monoespecífico o biespecífico). "Mejoramiento" también incluye acortar o reducir la duración de un síntoma.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr uno o más resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de conducta de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir la incidencia o mejora de uno o más síntomas de diversas enfermedades o afecciones asociadas a EGFRvIII (tales como, por ejemplo, mieloma múltiple), disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otro medicamento y/o retrasar la progresión de la enfermedad asociada a EGFRvIII de los pacientes. Se puede administrar una dosis eficaz en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosis eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede conseguirse o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "dosificación eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede obtenerse o se logra un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferiblemente, un ser humano. Mamíferos también incluyen, pero no se limitan a primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Tal como se utiliza en esta memoria, "vector" significa una construcción que es capaz de suministrar y, preferiblemente, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación

catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y determinadas células eucarióticas, tales como células productoras.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está enlazada operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se ha de transcribir.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, "soporte farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmunológico del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a cualquiera de los soportes farmacéuticos estándares, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina normal (al 0,9%). Composiciones que comprenden soportes de este tipo se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21^a Ed. Mack Publishing, 2005).

20 La expresión "etiqueta que contiene glutamina de donante de acilo" o "etiqueta de glutamina", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos de Gln que actúa como un aceptor de amina transglutaminasa. Véanse, p. ej., los documentos WO2012059882 y WO2015015448.

25 El término " k_{on} " o " k_a ", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (k_{on}/k_a y k_{off}/k_d) y las constantes de disociación en equilibrio se miden utilizando anticuerpos completos (es decir, bivalentes) y proteínas EGFRvIII monoméricas (p. ej., proteína de fusión EGFRvIII marcada con histidina).

30 El término " k_{off} " o " k_d ", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la constante de velocidad de disociación de un complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.

35 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en esta memoria incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En términos generales, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (p. ej., dentro del intervalo de confianza del 95% para la media) o dentro del 10 por ciento de el valor indicado, el que sea mayor. En los casos en los que el término "aproximadamente" se utilice dentro del contexto de un período de tiempo (años, meses, semanas, días, etc.), el término "aproximadamente" significa ese período de tiempo más o menos una cantidad del siguiente período de tiempo subordinado (p. ej. aproximadamente 1 año significa 11-13 meses; aproximadamente 6 meses significa 6 meses más o menos 1 semana; aproximadamente 1 semana significa 6-8 días; etc.), o dentro del 10 por ciento del valor indicado, lo que sea mayor.

50 Se entiende que siempre que se describan en esta memoria realizaciones con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan realizaciones análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

55 En los casos en los que aspectos o realizaciones de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención abarca no solo el grupo completo enumerado como un todo, sino cada uno de los miembros del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos y las expresiones en singular incluirán pluralidades y los términos y las expresiones en plural incluirán el singular.

65

En esta memoria se describen métodos y materiales ejemplares, aunque también se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o ensayo de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

5 **Anticuerpos EGFRvIII y Métodos de Producirlos**

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a EGFRvIII [p. ej., EGFRvIII humano (p. ej., número de acceso: P00533 Característica Identificador VAR_066493, o GenBank Nº de Acceso AJN69267; mrpsgtagaallallaalcp asraleekkgnyvvdthgscvracgadsyemeedgvrkckkcegpckvcngigifekdlsli
 10 natnikhfkncstisgdhlpvafrgdsfthppldpqeldilktvkeitgflliqawpenrt
 dlhafenleirrtkqhghqslavsvlnitslgrlskiesdgdvsiisgnknlcyaninwkk
 lfgtsgqtkiisnrgensckatgqvchalcspegcwgpeprdcvscrnvsrgrecvdkcnlle
 geprefvenseciqchpeclpqqamnitctgrpdnciqcahyidgphcvktcpagvmgenntlv
 wkyadaghvchlchpntcygctpglegcptngpkipsiatgmvgalllllvalgiglfmrrr
 15 hivrktlrrllqerelvepltpsgeapnqallrilketefkkikvigsfafgtvykglwipeg
 ekvkkipvailereatspkankeildeayvmasvndnphvcrlgicltstvtqlitqlmpfgcll
 dyvrehkdngsqyllnwcvqiakgmnyledrrlvhrdlaarnvlvktpqhvkkitdfglakllg
 aeekeyhaeggkvpikwmalesilhriythqsdvwsygvvwlmtfgskpydgipaseissil
 ekgerlpqpictidvymimvkcwmidadsrpkfreliefskmarpqrlyviaggdermhps
 20 ptdsnfyralmdeedmdvdvadeyilpqggffsspsstrtllsslsatsnntsvacidrngl
 qscpikedsflqryssdptgaldtsiddtflpvpeyinqsvpkprpagsvqnpvyhnpqlnpap
 srdphyqdpshstavnpeylntvqptcvnstfdspahwaqkqshqisldnpdyqqdfpkeakp ngifkgstaenaeylrvapqssefiga(SEQ ID NO:

25 201))) y caracterizado por una o más de las siguientes características: (a) disminuir o regular a la baja la expresión de la proteína de EGFRvIII; (b) tratar, prevenir, mejorar uno o más síntomas de una afección asociada con células malignas que expresan EGFRvIII en un sujeto (p. ej., cáncer tal como glioblastoma multiforme); (c) inhibir el crecimiento o la progresión del tumor en un sujeto (que tiene un tumor maligno que expresa EGFRvIII); (d) inhibir la metástasis de células cancerosas (malignas) que expresan EGFRvIII en un sujeto (que tiene una o más células malignas que expresan EGFRvIII); (e) inducir la regresión (p. ej., regresión a largo plazo) de un tumor que expresa EGFRvIII; (f) ejercer actividad citotóxica en células malignas que expresan EGFRvIII; (g) bloquear la interacción de EGFRvIII con otros factores aún por identificar; y/o (h) inducir un efecto de proximidad que mata o inhibe el crecimiento de células malignas que no expresan EGFRvIII en las proximidades.

35 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFRvIII, en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 143, 144 o 145; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 105, 106, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 135, 136, 140, 141, 146, 147, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235 o 237; y iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 67, 72, 73, 79, 85, 104, 107, 108, 114, 120, 126, 129, 142, 148, 219, 220, 221, 222, 223 o 236; y/o (b) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 149, 154, 156, 159, 162, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 176, 178, 181, 182, 185, 187, 190, 192, 195, 198, 238 o 239; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 150, 152, 155, 157, 160, 163, 172, 175, 179, 183, 186, 188, 191, 193, 196 o 199; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 151, 153, 158, 161, 164, 167, 177, 180, 184, 189, 194, 197 o 200.

50 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFRvIII, en donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217 o 218; y/o una región VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 211, 212, 213 o 215.

60 En esta memoria se proporciona un anticuerpo que tiene una cualquiera de las secuencias de cadena ligera parcial enumeradas en la Tabla 1 y/o una cualquiera de las secuencias de cadena pesada parcial enumeradas en la Tabla 1. En la Tabla 1, las secuencias subrayadas son secuencias de CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia.

Tabla 1

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|--------------|---|---|
| mAb m62G7 | DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCK <u>SSQSLLYSNGKTYLN</u> WLLQRP QSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGFYY <u>CVQDTHFPLTF</u> GAGTKLELK (SEQ ID NO: 2) | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKT <u>SGYTFD</u> YTLHWVKQSHVKSLEWI <u>GGIDPINGGTTY</u> NQKFKGKATLTV DKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC <u>ARGEAMDS</u> WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1) |
| h62G7 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC <u>KSSQSLLYSNGKTYLN</u> WFQQR GQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY <u>YCVQDTHFPLTF</u> GGGKVEIK (SEQ ID NO: 4) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFIDYTLHWVRQAPGQGLE WMGINPINGGTTYNQKFKGRVT MTRDTSTSTVYMELSLRSLEDTAV YYCARG <u>GEAMDS</u> WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 3) |
| h62G7-EQ/L6 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC <u>KSSQSLLYSNGKTYLN</u> WFQQR GQSPRRLIYQVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY <u>YCGQDTHFPLTF</u> GGGKVEIK (SEQ ID NO: 6) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFIDYTLHWVRQAPGQGLE WMGGIWPITGGTTYNQKFKGRVT MTRDTSTSTVYMELSLRSLEDTAV YYCARG <u>GEAQGS</u> WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 5) |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-----------------|--|---|
| h62G7 H14/L1-DV | DVVMTQSP LSL PVTLGQPASISC <u>KSSQSLLYSNDKTYTNWFQQR</u> P GQSPRRLLIY <u>EVSKLDV</u> GV PD RFSS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQDTHFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 8) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFD Y TLHWVRQAPGGQGLE WMGIGIWPITGGTTYNQKFKGRVT MTRDTSTSTVYMESSLRSED TAV YYCARGEAEGSWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 7) |
| 42G9 | EVVLTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNLA</u> WYQQKSGQAP RLLIYGSTIRATGVPARFSGSGS GTEFTLTISSELDFAVYYCQQQ <u>YSDWPF</u> TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 10) | QVTLKESGPVLLKPTETLTLTCTVS <u>GFSLSNPRM</u> GVSWIRQPPGKALE WFAHIFSTDEKSLKLSLRSLTLSK DTSKSOVVLMTNMAPVDSATYY <u>CARDSSN</u> YEGYFD F WGQGTLLVTV SS (SEQ ID NO: 9) |
| 32A10 | EVVMTQSPATLSVSPGERVTLSC <u>RASQSVSSNFA</u> WYQQRPGQAP RLLLYGATTRATGLPGRFSGSGS GTENILTISSLDSEDFAIYFCQQY <u>KDWPFT</u> FGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 12) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNAR</u> MGVSWIRQPPGKAL EWLAHIFSTDEKSI RR SLRSLTLS KDTSKSOVVLMTNMDPVD TATY <u>FCARDSSN</u> YEGYFD F WGQGTLLVTV VSS (SEQ ID NO: 11) |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-------------|--|---|
| mAb 20B9 | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RVSQSIGANLAWYQQKFGQAPR</u> LLIY <u>GASTRATGIPVRFSGGSG</u> TEFTLTSSLSQSEDFAYSC <u>QQYIY</u> <u>WPFTFGPGTGVTDIK</u> (SEQ ID NO: 14) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWLGHIFSTDEKSYSTSLRGRITIS KDTSRGLVWLTLTNMDPVDATY CARDSSNYEGYFDWFPGFLVTV SS (SEQ ID NO: 13) |
| 14C11 | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVSNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIY <u>GASTRATGVPARFSGSDS</u> GTEFSLTSSLSQSEDFAVYFC <u>QQ</u> <u>YKDWPFITFGPGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 16) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLNNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWFHIFSTDEKSFRTSLRSLRTL SKDTSKQVVL TMTNMDPVDAT YYCARDSSNYEGYFDYWGQGILV TVSS (SEQ ID NO: 15) |
| 21E11 | DMVVTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVGSDLAWYQQPPGQSP</u> RLLIY <u>GASTRATGVPARFSGSGS</u> GTDFTLTITSLESEDFAVYCYC <u>QQY</u> <u>NDWPFITFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 18) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNVRMGVSWIRQPPGKAL</u> EWFHIFSSDEKSIIRRSLSRSLTSL KDTSKQVVL TMTNMDPVDATY YCARDSSNYEGYFDWFPGQGLVTV VSSN (SEQ ID NO: 17) |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-------|--|--|
| 49B11 | EMEVTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQIGSDL</u> AWYQQQSGQAP RLLIS <u>GASTRAT</u> GVPTFRFSGSGS GTDFTLTITSLQSEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YNDWPF</u> TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 20) | QVTLKESGPNLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNVR</u> MGVSWIRQPPGKAL EWFA <u>HIFSSDEK</u> SIRRSRSLRSLTSL KDTSKSQVVLMTNMDPVDATY YCARD <u>SSNYEGYFDY</u> WGGGTLVT VSS (SEQ ID NO: 19) |
| 46E10 | EVVMTQSPNLSVSPGERATLSC <u>RASQSVTSNFA</u> WYQQRPGQSP RLLLY <u>GASTRAT</u> GVPTFRFSGSG SGTENILTISSLQSEDFAVYFC <u>QQ</u> <u>YKDWPF</u> TFGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 22) | QVTLKESGPNLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNAR</u> MGVSWIRQPPGKAL EWLA <u>HIFSTDEK</u> SIRRSRSLRSLTSL KDTSKSQVVLMTNMDPVDATY CAR <u>DSSNYEGYFDY</u> WGGGTLVT SS (SEQ ID NO: 21) |
| 12H6 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQGVSSNFA</u> WYQQRPGQSP RLLLY <u>GASTRAT</u> GVPTFRFSGSG SGTENILTISSLQSEDFAVYFC <u>QQ</u> <u>YKDWPF</u> TFGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 24) | QVTLKESGPNLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNAR</u> MGVSWIRQPPGKAL EWLA <u>HIFSTDEK</u> SIRRSRSLRSLTSL KDTSKSQVVLMTNMDPVDATY YCARD <u>SSNYEGYFDY</u> WGGGTLVT VSS (SEQ ID NO: 23) |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-------------|---|---|
| mAb 19A9 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVNRNLA</u> WYQQKPGQAP RLLIF <u>GTSTRAT</u> GIPARFSGSGSG TEFTLTIDSLQSEHSGLYYC <u>QQY</u> <u>NDWPF</u> TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 26) | QVTLEESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNAR</u> MGVSWIRQPPGKAP EWFA <u>HIFSTDEKSLR</u> LSRLTL SKDTSKSQVVL TMTNMDPVDAT YYC <u>ARDSSN</u> YEGYFDYWGGGTLV TVSS (SEQ ID NO: 25) |
| 11B11 | EVLMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVSTNFA</u> WYQQRPGQAP RLLLF <u>GASTRAI</u> GIPGRFSGSGS GTENILTISSLQSEDFAIYFC <u>QQY</u> <u>KDWP</u> FTFGPGSKVEIK (SEQ ID NO: 28) | QVTLKESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNAK</u> MGVSWIRQPPGKAL EWLA <u>HIFSTDEKSIR</u> RSRLTM SKDTSKSQVVL TMTNMDPVDAT YYC <u>VRDSSN</u> YEGYFDYWGGGTLV TVSS (SEQ ID NO: 27) |
| 21E7 | DVVLTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVNSNLA</u> WYQQNPGQAP RLLIF <u>GSSTRAI</u> GIPASFGSGSGS TEFTLTINSLQSEHSVYCYC <u>QQY</u> <u>NDWPF</u> TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 29) | QVTLEESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNAR</u> MGVSWIRQPPGKAP EWFA <u>HIFSTDEKSLR</u> LSRLTL SKDTSKSQVVL TMTNMDPVDAT YYC <u>ARDSSN</u> YEGYFDYWGGGTLV TVSS (SEQ ID NO: 25) |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-------------|---|--|
| mAb 12B2 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVINNLAWYQQKPGQAPR</u> LLIY <u>GTSTRAT</u> DIPARFSGSGGT EFTLTISSLSQSEDFAVYYC <u>QDYN</u> <u>NWPFTFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 31) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNPRM</u> GVSWIRQPPGKAL EWLGH <u>HIFSSDEKSYRLSLRSL</u> SIS KDTSKQVVLTMNMDPVDATY YCVR <u>DSSNYGGYFDY</u> WGQGLTV TVSS (SEQ ID NO: 30) |
| 11F10 | EIVMTQSPATLSVSPGERTTLLSC <u>RASQSVGSNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIY <u>GASTRASG</u> VPARFSGSGS GTEFTLTISSLSQSEDFAVYSC <u>QIEY</u> <u>NNWPFTFGQGTKEIK</u> (SEQ ID NO: 33) | QVTLKESGPVLVKPIETLTLTCTVC <u>GFSLSNPRM</u> GVSWIRQPPGKALE WLGH <u>HIFSSDEKSYRLFLRSL</u> SISK DTSKQVVLTMNMDPVDATYY CAR <u>DSSDYEGYFDY</u> WGQGLVTV SS (SEQ ID NO: 32) |
| 17G11 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVINNLAWYQQKPGQAPR</u> LLIY <u>GTSTRAT</u> DIPARFSGSGSGT EFTLTISSLSQSEDFAVYYC <u>QDYN</u> <u>NWPFTFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 31) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVF <u>GFSLSNPRM</u> GVSWIRQPPGKAPE WLGH <u>HIFSSDEKSYRLSLRSL</u> SISK DTSKQVVFXTNMDPDPATYY CVR <u>DSSNYEEYFDY</u> WGQGLVTV SS (SEQ ID NO: 34) |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-------|--|--|
| 29D5 | <p>KIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RANQIVSSNLA</u>WYQQKPGQAPR LLVFGTSTRATGIPIRFSGSGSGT EFTLTVSSLQSEDFAVYVCCQQYN <u>DWPFITFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 36)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLNPRMGVSWLRQPPGKAL</u> EWF<u>AHIFSTDEKSYSPSLRGLTV</u> SKDTSKQVWLTLTNMDPVDTATY YCARDSSNYEGYFDYWGQGLTVT VSS (SEQ ID NO: 35)</p> |
| 30D8 | <p>DIVMTQSPPLSLVTPGEPASISCR <u>SSQSLLNHNKRNNYLD</u>WFLQKPG QSPQLLIY<u>LASNRA</u>SGVPDRFSG GSGGTDFTLKISRVEAEDVGVVY <u>CMQAQQTPIITFGQGRLEIK</u> (SEQ ID NO: 38)</p> | <p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCE <u>ASGFTFSDAWMSWVRQAPGKGL</u> EWVGR<u>IKSKTDGGTTDYYVPLNG</u> RFIIIRDSDSRNTLYLQLNCLKTEDI AVYYCTT<u>VPGSYGYWGQGLVTV</u> SS (SEQ ID NO: 37)</p> |
| 20E12 | <p>DIVLTQSPPLSLVTPGEPASISCR <u>SSQSLLYSNGKNYLD</u>WFLHKPG QSPQLLIY<u>LGSNRA</u>SGVPDRFSG SSGGIDFILKISRVEAEDVGVVY <u>MQAQQTPIITFGQGRLEIK</u> (SEQ ID NO: 40)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE <u>ASGFTFSYAWMSWVRQAPGKGL</u> EWVGR<u>IKSIADGGATDYAAPVRN</u> RFTISRDDSRNTLYLEMHSLKTED TAVYYCTT<u>IPGNDAFDMWGQGTM</u> VTVSS (SEQ ID NO: 39)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|------|--|--|
| 26B9 | <p>DIVLTQSP^LSLPVTGPESISCR <u>SSQSLLRDGFNYLDWFLKPG</u> QSPQLLYLASSRASGVPDFRFSG SDSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY <u>CMQALQTPITFGQGRLEIK</u> (SEQ ID NO: 42)</p> | <p>EVQLVESGWLVKPGGSLRLSCA ASGFIFNNAWMSWVRQAPGKGLE WIGRIKSKSDGGTTDYAAPVKDRF TISRDDSKDTLYLQMNGLKTEDTA VYFCTTAPGGPFDFYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 41)</p> |
| 32G8 | <p>DIVLTQSP^LSLSVTPGEPASISCR <u>SSQSLLYSNGKNYLDWFLHKPG</u> QSPQLLYLGSNRASGVPDFRFSG SSGIDFILKISRVEAEDVGVYYC <u>MQAQQTPITFGQGRLEIK</u> (SEQ ID NO: 40)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE ASGFTFSYAWMSWVRQAPGKGL EWVGRIKSITDGGVIDYAAPVRNR CTISRDDSRNTLYLEMHSLKTEDT AVYYCTTIPGNDDDFDMWGQGRM VTVSS (SEQ ID NO: 43)</p> |
| 34E7 | <p>DIVLTQSP^LSLSVTPGEPASISCR <u>STQSLLYSNGKNYLDWFLHKPG</u> QSPQLLIFLGSIRASGVPDFRFSG SSGIDFILKISRVEAEDVGVYYC <u>MQAQQTPITFGQGRLEIK</u> (SEQ ID NO: 45)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE ASGFTFSYAWMSWVRQAPGKGL EWVGRIKSINDGGATDYASPVRN RFTISRDDSRNMLYLEMHSLKTED TAVYYCTTIPGNDAFDMWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 44)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|------|---|---|
| 20G5 | <p>DIVLTQSP^LSLPVT^PGEPA^SISCR <u>SSQSLLYSDRRRN</u>YLDWFLQKPG QSPHLLIY<u>LGSYRAS</u>GV^PDRFSG SSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYY <u>CMQALQIPIT</u>FGQGT^RLEIK (SEQ ID NO: 47)</p> | <p>EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCA ASGFTFTNAWMSWVRQAPGKGL EWVGR<u>IKSKIDGGTTD</u>YAAPVKG RFIISRD^SSKNTLSLQMNSLKTEDT AMYYCTT<u>APGGPF</u>DYWGQGS^LV TVSS (SEQ ID NO: 46)</p> |
| C6 | <p>ELQSVLTQPPSASGTPGQRTIS <u>CSSSSNIGSN</u>YVY^WYQQLPGT APKILY<u>RNNQRPS</u>GV^PDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>AAWDDNL</u>SGWVFGTGT^KLTVL (SEQ ID NO: 49)</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV^SCK ASGDTFSSNAISWVRQAPGQGLE WMGVI<u>IFGTADYA</u>QKFOGRV^TIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CAR<u>H</u>TY<u>HEYAGGYGGAMD</u>PWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)</p> |
| B5 | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC <u>RASQISSYL</u>NWYQQKPGKAPK LLIY<u>AASSLQSG</u>VPSRFSGSGSG TDFTLTIS^SLQPEDFATY^CQQSY <u>STPLT</u>FGQGT^KVEIK (SEQ ID NO: 51)</p> | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSN<u>YAMSWVRQAPGKGLE</u> WVSD<u>ISGGGR</u>TYADSVKGRFTI SRD^NSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR<u>AGLLYGGGV</u>PM<u>D</u>WGGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|---------|--|---|
| 42G9-1 | <p>EVVLTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNLA</u>WYQQKSGQAP RLLIY<u>GSTIRAT</u>GVPARFSGSGS GTEFTLTISLSQSEDFAVYYC<u>QQ</u> <u>YSDWPFIF</u>GGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 10)</p> | <p>QVTLKESGPVLLKPTETLTLTCTVS <u>GFSLSNPRMGV</u>SWIRQPPGKALE WFA<u>HIFSTDEKSL</u>KLSLRSRLTLSK DTSKSQVVLTMNMAPVDSATYY CAR<u>X₁X₂</u><u>SNVEGYFDF</u>WGGGTLVT VSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 52)</p> |
| 32A10-1 | <p>EVVMTQSPATLSVSPGERVTLSC <u>RASQSVSSNFA</u>WYQQRPGQAP RLLLY<u>GATTRAT</u>GLPGRFSGSGS GTENILTISSLSQSEDFAIYFC<u>QQY</u> <u>KDWPFTIF</u>GGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 12)</p> | <p>QVTLKESGPVLLKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNARMGV</u>SWIRQPPGKAL EWLA<u>HIFSTDEKSI</u>RRSLRSRLTLS KDTKSQVVLTMNMDPVDATY FCAR<u>X₁X₂</u><u>SNVEGYFDY</u>WGGGTLV TVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 53)</p> |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-----------------------|---|---|
| <p>mAb 20B9-1</p> | <p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RVSQSIGANLAWYQQKFGQAPR</u> LLIYGASTRATGIPVRFSGGGSSG TEFTLTISSLQSEDFAIYSC<u>QQYIY</u> <u>WPFIFGPGTTVDIK</u> (SEQ ID NO: 14)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWLG<u>HIFSTDEKSYSTSLRGRITIS</u> KDTSRGLVLTNTNMDPVDATYY CAR<u>X₁X₂SNYEGYDFEWF</u>PGFLVT VSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 54)</p> |
| <p>14C11-1</p> | <p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVSNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIYGASTRATGVPARFSGSDS GTEFSLTISSLQSEDFAVYFC<u>QQ</u> <u>YKDWPFIFGPGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 16)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWF<u>HIFSTDEKSFRTSLRSRLTL</u> SKDTSKSQVLTMTNMDPVDAT YYCAR<u>X₁X₂SNYEGYFDY</u>WGGGIL VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 55)</p> |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|----------------|--|--|
| mAb 21E11-1 | DMVVTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVGSDLA</u> WYQQPPGQSP RLLIY <u>GASTRAI</u> GVPTFRFSGSGS GTDFTLITTSLESEDFAVYYC <u>QQY</u> <u>NDWPFT</u> FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 18) | QVTLKESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNV</u> RMGVSWIRQPPGKAL EWFA <u>HIFSSDEK</u> SIRRSLSRRLTSL KDTSKSQVVLMTNMDPVDATY YCAR <u>X₁X₂SN</u> YEGYDFWGGQGLV TVSSN, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 56) |
| 49B11-1 | EMEVTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQNI</u> GSDLAWYQQQSGQAP RLLIS <u>GASTRAI</u> GVPTFRFSGSGS GTDFTLITTSLSQSEDFAVYYC <u>QQQ</u> <u>YNDWPFT</u> FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 20) | QVTLKESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNV</u> RMGVSWIRQPPGKAL EWFA <u>HIFSSDEK</u> SIRRSLSRRLTSL KDTSKSQVVLMTNMDPVDATY YCAR <u>X₁X₂SN</u> YEGYDFWGGQGLV TVSS, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 57) |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|----------------|--|---|
| mAb 46E10-1 | EVVMTQSPPNLSVSPGERATLSC <u>RASQSVTSNFAWYQQRPGQSP</u> RLLLY G ASTRATGVPRFSGSG SGTENILTISSLQSEDFAVYFC QQ <u>YKDWPFTFGPGSKVDIK</u> (SEQ ID NO: 22) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWLA HIFSTDEKSIRRSLSRSL TL KDTSKQVVLMTNMDPVDATYY CAR X₁X₂SNYEGYFDYW GQGLVT VSS, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 58) |
| 12H6-1 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQGVSSNFAWYQQRPGQSP</u> RLLLY G ASTRATGVPRFSGSG SGTENILTISSLQSEDFAVYFC QQ <u>YKDWPFTFGPGSKVDIK</u> (SEQ ID NO: 24) | QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV <u>SGFSLSNARMGVSWIRQPPGKAL</u> EWLA HIFSTDEKSIRRSLSRSL TL KDTSKQVVLMTNMDPVDATY YCAR X₁X₂SNYEGYFDYW GQGLV TVSS, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 59) |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|---------|---|--|
| 19A9-1 | <p>EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVNRNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIFG<u>STRAT</u>GIPARFSGSGG TEFTLTIQSEHSGLY<u>CCQQY</u> <u>NDWPF</u>TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 26)</p> | <p>QVTLKEESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNARMGVSWIRQPPGKAP</u> EWFA<u>HIFSTDEKSLRSLRSRLTL</u> SKDTSKSQVVLMTNMDPVDAT YYCAR<u>X₁X₂SNYEGYFDYWGQGT</u>L VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 60)</p> |
| 11B11-1 | <p>EVLMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVSTNFAWYQQRPGQAP</u> RLLLF<u>GASTRAI</u>GIPGRFSGSGS GTENILTISSLQSEDFAIY<u>FCQQY</u> <u>KDWP</u>FTFGPGSKVEIK (SEQ ID NO: 28)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLTCTV <u>SGFSLSNAKMGVSWIRQPPGKAL</u> EWLA<u>HIFSTDEKSI</u>RRSLRSLTM SKDTSKSQVVLMTNMDPVDAT YYCVR<u>X₁X₂SNYEGYFDYWGQGT</u>L VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 61)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|--------|---|---|
| 21E7-1 | <p>DWVLTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVNSNLA</u>WYQQNPGQAP RLLIFGSSTRATGIPASFGSGSG TEFTLTINSLQSEHSVYYCQQY <u>NDWPFIFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 29)</p> | <p>QVTLEESGPVLVKPTETLTLTCTV SGFSLSNARMGVSWIROPPGKAP EWFAHIFSSDEKSLRSLRSLRTL SKDTSKSQVLTMTNMDPVDTAT YYCARX₁X₂SNYEGYFDYWGQGTL VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 202)</p> |
| 12B2-1 | <p>EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVINNLAW</u>YQQKPGQAPR LLIYGTSTRATDIPARFSGSGGT EFTLTISLQSEDFAVYYCQDYN <u>NWPFIFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 31)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV SGFSLSNPRMGVSWIROPPGKAL EWLGHIFSSDEKSYRSLRSLRSLIS KDTSKSQVLTMTNMDPVDTATY YCVRX₁X₂SNYGGYFDYWGQGTL VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 203)</p> |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|----------------|--|---|
| mAb 11F10-1 | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVGSNLA</u> WYQQKPGQAP RLLIY GASTRASG VPARFSGSGS GTEFTLTISSLSQSEDFAVYSCQ Q EY <u>NNWPF</u> TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 33) | QVTLKESGPVLVKPIETLTLTCTVC <u>GFSLSNPR</u> MGVSWIRQPPGKALE WLGH IFSSDEKSYR LFRLRSLSISK DTSKSQVLTMTNMDPVDATYY CAR X₁X₂SDYEGYFDY WGQGLVT VSS, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 204) |
| 17G11-1 | EVVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVINNLA</u> WYQQKPGQAPR LLIIY GTSTRAITDIPARFSGSGS GT EFTLTISSLSQSEDFAVY YCQDYN <u>NWPF</u> TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 31) | QVTLKESGPVLVKPTETLTTLCTVVF <u>GFSLSNPR</u> MGVSWIRQPPGKAPE WLGH IFSSDEKSYR LSRLRSLSISK DTSKSQVVFXTNMDPGDPATYY CVR X₁X₂SNVEEYFDY WGQGLVT VSS, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 205) |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|--------|---|---|
| 29D5-1 | <p>KIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RANQIVSSNLA</u>WYQQKPKGQAPR LLVFGTSTRATIGIPRFSGSGSGT EFTLTVSSLSQSEDFAVYVC<u>QQYN</u> <u>DWPFITFGPGTKVDIK</u> (SEQ ID NO: 36)</p> | <p>QVTLKESGPVLVKPTETLLTCTV <u>SGFSLSNPRM</u>GVSWLRQPPGKAL EWFAHIFSTDEKSYSPSLR<u>GR</u>LTV SKDTSKSQVWLTLTNMDPVDTATY YCAP<u>X₁X₂SNVEGYFDY</u>WGQGLV TVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 206)</p> |
| 30D8-1 | <p>DIVMTQSPLSLPTPGEPAISCR<u>R</u> <u>SSQSLLHNKRNNYL</u>DWFLQKPG QSPQLLIY<u>LASNRA</u>SGVPDFRFSG GSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYY <u>CMQAQQTPIITFG</u>QGTRLEIK (SEQ ID NO: 38)</p> | <p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCE <u>ASGFTFSD</u>AWMSWVRQAPGKGL EWVGR<u>IKSKTX₁X₂GTTD</u>YVVPLN <u>GRFI</u>SRDSDSRNTLYLQLNLIKTED TAVYYCTT<u>VPGSYGY</u>WGQGLVT VSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 207)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|---------|---|---|
| 20E12-1 | <p>DIVLTQSP^LSLSPVTPGEPASISCR <u>SSQSLLYSX₁X₂KNYLDWFLH</u>KP GQSPQLLYL<u>GSNRAS</u>GVPPDRFS GSGSGIDFILKISRVEAEDVGVVY <u>CMQAQQTPIITFGQ</u>TRLEIK, , wherein X₁ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W, and X₂ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W (SEQ ID NO: 211)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE ASGFTFSYAWMSWVROAPGKGL EWVGRIKSIAX₁X₂GATDYAAPVVRN RFTISRDDSRNTLYLEMHSLKTED TAVYYCTT<u>IPGNDAFDM</u>WGQGTM VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 208)</p> |
| 26B9-1 | <p>DIVLTQSP^LSLSPVTPGEPASISCR <u>SSQSLLRHX₁X₂FNYLDWFLQ</u>KP GQSPQLLYL<u>ASSRAS</u>GVPPDRFS GSDSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC<u>MQALQTPITFGQ</u>TRLEIK, wherein X₁ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W, and X₂ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W (SEQ ID NO: 212)</p> | <p>EVQLVESWGVLVKPGGSLRLSCA ASGFIFNNAWMSWVROAPGKGLE WIGRIKSKSX₁X₂GTTDYAAPVKDR FTISRDDSKDTLYLQMNGLKTEDT AVYFCTT<u>APGGPFDY</u>WGQGTLVV VSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 209)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|--------|--|--|
| 32G8-1 | <p>DIVLTQSP^LLSL^SSVTPGEPASISCR <u>SSQSLLYSX₁X₂KNYLDWFLHKP</u> GQSPQLLIYLGSNRASGV^PDRFS GSGGIDFILKISRVEAEDVGVYY <u>CMQAQQTPIITFGQGRLEIK</u>, wherein X₁ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W, and X₂ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W (SEQ ID NO: 213)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE ASGFTFSYAWMSWVRQAPGKGL EWVGRIKSITX₁X₂GVIDYAAPVRN RCTISRDDSRNMLYLEMHSLKTED TAVYYCTTIPGNDDFDMMWGQGRM VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 210)</p> |
| 34E7-1 | <p>DIVLTQSP^LLSL^SSVTPGEPASISCR <u>STQSLLYSX₁X₂KNYLDWFLHKP</u> GQSPQLLIYFLGSIRASGV^PDRFS GSGGIDFILKISRVEAEDVGVYY <u>CMQAQQTPIITFGQGRLEIK</u>, wherein X₁ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W, and X₂ is R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W (SEQ ID NO: 215)</p> | <p>EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCE ASGFTFSYAWMSWVRQAPGKGL EWVGRIKSINX₁X₂GATDYASVVRN RFTISRDDSRNMLYLEMHSLKTED TAVYYCTTIPGNDAFDMMWGQGTI VTVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 214)</p> |

(continuación)

| | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|-----------------------|---|---|
| <p>mAb 20G5-1</p> | <p>DIVLTQSP^LSLPVTGPGEPAISCR <u>SSQSLLYSDRRRNYLDWFLQKPG</u> QSPHLLIY<u>LGSYRAS</u>GVPDFRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVY <u>CMQALQIPIT</u>FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 47)</p> | <p>EVQLVESGGDLVVKPGGSLRLSCA <u>ASGFTFTINAWMSWVRQAPGKGL</u> <u>EWVGRIKSKIX₁X₂GTTDYAAPVKG</u> RFIIRDDSKNTLSLQMNSLKTEDT AMYCYCTT<u>APGGPF</u>DYWGQGSV TVSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 216)</p> |
| <p>C6-1</p> | <p>ELQSVLTQPPSASGTPGQRTVIS <u>CSSSSNIGSNVYVYQQLP</u>GT APKILYRNNQRPSGVPDFRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>AAWDDNLSGWVFGTGT</u>KLTVL (SEQ ID NO: 49)</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK <u>ASGDTFSSNAISWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGVIIIFGTADYAQK</u>FQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY <u>CARHTYHEYAGGYGGAMX₁X₂W</u> GGGTLTVTSS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 217)</p> |

(continuación)

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|------|---|---|
| B5-1 | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC <u>RASQSISSYLNWYQQKPKAPK</u> LLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSY</u> <u>STPLTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 51)</p> | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVS<u>DISGGGRTYY</u>AX₁X₂VKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR<u>AGLLYGGGVYPM</u>DIWG QGTLVTVS, en donde X₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, or W, y X₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, o W (SEQ ID NO: 218)</p> |

También se proporcionan en esta memoria porciones de CDR de dominios de unión a antígeno de anticuerpos para EGFRvIII (incluyendo CDRs de Chothia, Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de las regiones de CDR está dentro del conocimiento de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDRs pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas "CRs combinadas" o "CDRs extendidas"). En algunas realizaciones, las CDRs son las CDRs de Kabat. En otras realizaciones, las CDRs son las CDRs de Chothia. En otras palabras, en realizaciones con más de una CDR, las CDRs pueden ser cualquiera de las CDRs de Kabat, Chothia, de combinación o combinaciones de las mismas. La Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de CDR proporcionadas en esta memoria.

10 Tabla 2

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|---|-----------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| m62G7 | TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (extendida) | GIDPINGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 65) (Kabat) GIDPINGGTTY (SEQ ID NO: 66) (Chothia) | GEAMDS (SEQ ID NO: 67) |
| h62G7 | TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (extendida) | GINPINGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 68) (Kabat) GINPINGGTTY (SEQ ID NO: 69) (Chothia) | GEAMDS (SEQ ID NO: 67) |
| h62G7-H14 | TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (extendida) | GIWPITGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 70) (Kabat) GIWPITGGTTY (SEQ ID NO: 71) (Chothia) | GAEAGS (SEQ ID NO: 72) |
| h62G7-EQ | TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (extendida) | GIWPITGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 70) (Kabat) GIWPITGGTTY (SEQ ID NO: 71) (Chothia) | GEAQGS (SEQ ID NO: 73) |
| 42G9 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSTDEKSLKLSLRS (SEQ ID NO: 77) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia) | DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79) |
| 32A10 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSIRRSLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 20B9 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSYSTSLRG (SEQ ID NO: 86) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia) | DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|--|------------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 14C11 | NNARMGVS (SEQ ID NO: 88) (Kabat); GFSLNNAR (SEQ ID NO: 89) (Chothia); GFSLNNARMGVS (SEQ ID NO: 90) (extendida) | HIFSTDEKSFRTSLRS (SEQ ID NO: 91) (Kabat) HIFSTDEKSF (SEQ ID NO: 92) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 21E11 | SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (extendida) | HIFSSDEKSIRRLRS(SE Q ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia) | DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79) |
| 49B11 | SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (extendida) | HIFSSDEKSIRRLRS(SE Q ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 46E10 12H6 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 19A9 21E7 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSLRLSLRS (SEQ ID NO: 98) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 11B11 | SNAKMGVS (SEQ ID NO: 99) (Kabat); GFSLSNAK (SEQ ID NO: 100) (Chothia); GFSLSNAKMGVS (SEQ ID NO: 101) (extendida) | HIFSTDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 12B2 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLSLRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | DSSNYGGYFDY (SEQ ID NO: 104) |
| 11F10 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLFLRS (SEQ ID NO: 105) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | DSSDYEGYFDY (SEQ ID NO: 107) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|--|------------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 17G11 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLSLRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | DSSNYEEYFDY (SEQ ID NO: 108) |
| 29D5 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSTDEKSYSPSLRG (SEQ ID NO: 106) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia) | DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85) |
| 30D8 | SDAWMS (SEQ ID NO: 109) (Kabat); GFTFSD (SEQ ID NO: 110) (Chothia); GFTFSDAWMS (SEQ ID NO: 111) (extendida) | RIKSKTDGGTTDYVVPLNG (SEQ ID NO: 112) (Kabat) RIKSKTDGGTTDY (SEQ ID NO: 113) (Chothia) | VPGSYGY (SEQ ID NO: 114) |
| 20E12 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSIADGGATDYAAP VRN (SEQ ID NO: 118) (Kabat) RIKSIADGGATDY (SEQ ID NO: 119) (Chothia) | IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120) |
| 26B9 | NNAWMS (SEQ ID NO: 121) (Kabat); GFIFNN (SEQ ID NO: 122) (Chothia); GFIFNNAWMS (SEQ ID NO: 123) (extendida) | RIKSKSDGGTTDYAAP VKD (SEQ ID NO: 124) (Kabat) RIKSKSDGGTTDY (SEQ ID NO: 125) (Chothia) | APGGPFYD (SEQ ID NO: 126) |
| 32G8 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSITDGGVIDYAAPV RN (SEQ ID NO: 127) (Kabat) RIKSITDGGVIDY (SEQ ID NO: 128) (Chothia) | IPGNDDFDM (SEQ ID NO: 129) |
| 34E7 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSINDGGATDYASPV RN (SEQ ID NO: 130) (Kabat) RIKSINDGGATDY (SEQ ID NO: 131) (Chothia) | IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120) |
| 20G5 | TNAWMS (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFTN (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFTNAWMS (SEQ ID NO: 134) (extendida) | RIKSKIDGGTTDYAAPV KG (SEQ ID NO: 135) (Kabat) RIKSKIDGGTTDY (SEQ ID NO: 136) (Chothia) | APGGPFYD (SEQ ID NO: 126) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|---|---|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| C6 | SSNAIS (SEQ ID NO: 137) (Kabat); GDTFSS (SEQ ID NO: 138) (Chothia); GDTFSSNAIS (SEQ ID NO: 139) (extendida) | VIIPIFGTADYAQKFQG (SEQ ID NO: 140) (Kabat) VIIPIFGTADY (SEQ ID NO: 141) (Chothia) | HTYHEYAGGYGG AMDP (SEQ ID NO: 142) |
| B5 | SNYAMS (SEQ ID NO: 143) (Kabat); GFTFSN (SEQ ID NO: 144) (Chothia); GFTFSNYAMS (SEQ ID NO: 145) (extendida) | DISGGGGRTYYADSVK G (SEQ ID NO: 146) (Kabat) DISGGGGRTYY (SEQ ID NO: 147) (Chothia) | AGLLYGGGVYPM DI (SEQ ID NO: 148) |
| 42G9-1 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSTDEKSLKLSLRS (SEQ ID NO: 77) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYDFD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 219) |
| 32A10-1 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 20B9-1 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSYSTSLRG(S EQ ID NO: 86) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYDFD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 219) |
| 14C11-1 | NNARMGVS (SEQ ID NO: 88) (Kabat); GFSLNNAR (SEQ ID NO: 89) (Chothia); GFSLNNARMGVS (SEQ ID NO: 90) (extendida) | HIFSTDEKSFRTSLRS (SEQ ID NO: 91) (Kabat) HIFSTDEKSF (SEQ ID NO: 92) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 21E11-1 | SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (extendida) | HIFSSDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYDFD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 219) |

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|---|---|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 49811-1 | SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (extendida) | HIFSSDEKSIRRLSRS(SE Q ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 46E10-1 12H6-1 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSIRRLSRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 19A9-1 21E7-1 | SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (extendida) | HIFSTDEKSLRLSRS (SEQ ID NO: 98) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 11B11-1 | SNAKMGVS (SEQ ID NO: 99) (Kabat); GFSLSNAK (SEQ ID NO: 100) (Chothia); GFSLSNAKMGVS (SEQ ID NO: 101) (extendida) | HIFSTDEKSIRRLSRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |
| 12B2-1 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLSRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYGGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 221) |
| 11F10-1 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLFLRS (SEQ ID NO: 105) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | X ₁ X ₂ SDYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 222) |
| 17G11-1 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSSDEKSYRLSRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEEYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 223) |
| 29D5-1 | SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (extendida) | HIFSTDEKSYSPSLRG (SEQ ID NO: 106) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia) | X ₁ X ₂ SNYEGYFDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 220) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|---|---|----------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 30D8-1 | SDAWMS (SEQ ID NO: 109) (Kabat); GFTFSD (SEQ ID NO: 110) (Chothia); GFTFSDAWMS (SEQ ID NO: 111) (extendida) | RIKSKTX ₁ X ₂ GTTDYVV PLNG, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 224) (Kabat) RIKSKTX ₁ X ₂ GTTDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 225) (Chothia) | VPGSYGY (SEQ ID NO: 114) |
| 20E12-1 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSIAX ₁ X ₂ GATDYAAP VRN, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 226) (Kabat) RIKSIAX ₁ X ₂ GATDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 227) (Chothia) | IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120) |
| 26B9-1 | NNAWMS (SEQ ID NO: 121) (Kabat); GFIFNN (SEQ ID NO: 122) (Chothia); GFIFNNAWMS (SEQ ID NO: 123) (extendida) | RIKSKSX ₁ X ₂ GTTDYAAP VKD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 228) (Kabat) RIKSKSX ₁ X ₂ GTTDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 229) (Chothia) | APGGPFDDY (SEQ ID NO: 126) |
| 32G8-1 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSITX ₁ X ₂ GVIDYAAP VRN, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 230) (Kabat) RIKSITX ₁ X ₂ GVIDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 231) (Chothia) | IPGNDDFDM (SEQ ID NO: 129) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|---|---|---|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 34E7-1 | SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (extendida) | RIKSINX ₁ X ₂ GATDYASP VRN, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 232) (Kabat) RIKSINX ₁ X ₂ GATDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 233) (Chothia) | IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120) |
| 20G5-1 | TNAWMS (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFTN (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFTNAWMS (SEQ ID NO: 134) (extendida) | RIKSKIX ₁ X ₂ GTTDYAAP VKG, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 234) (Kabat) RIKSKIX ₁ X ₂ GTTDY, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 235) (Chothia) | APGGPFDDY (SEQ ID NO: 126) |
| C6-1 | SSNAIS (SEQ ID NO: 137) (Kabat); GDTFSS (SEQ ID NO: 138) (Chothia); GDTFSSNAIS (SEQ ID NO: 139) (extendida) | VIIPIFGTADYAQKFQG (SEQ ID NO: 140) (Kabat) VIIPIFGTADY (SEQ ID NO: 141) (Chothia) | HTYHEYAGGYYGG AMX ₁ X ₂ , en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 236) |
| B5-1 | SNYAMS (SEQ ID NO: 143) (Kabat); GFTFSN (SEQ ID NO: 144) (Chothia); GFTFSNYAMS (SEQ ID NO: 145) (extendida) | DISGGGGRYYAX ₁ X ₂ V KG, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 237) (Kabat) DISGGGGRYY (SEQ ID NO: 147) (Chothia) | AGLLYGGGVYPM DI (SEQ ID NO: 148) |
| Cadena Ligera | | | |
| mAb | CDRL1 | CDRL2 | CDRL3 |
| m62G7 h62G7 | KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 149) | LVSKLDS (SEQ ID NO: 150) | VQDTHFPLT (SEQ ID NO: 151) |
| h62G7- L6 | KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 149) | QVSKLDS (SEQ ID NO: 152) | GQDTHFPLT (SEQ ID NO: 153) |
| h62G7- L1-DV | KSSQSLLYSNDKTYTN (SEQ ID NO: 154) | EVSKLDV (SEQ ID NO: 155) | GQDTHFPLT (SEQ ID NO: 153) |
| 42G9 | RASQSVRSNLA (SEQ ID NO: 156) | GSTIRAT (SEQ ID NO: 157) | QQYSDWPFT (SEQ ID NO: 158) |
| 32A10 | RASQSVSSNFA (SEQ ID NO: 159) | GATTRAT (SEQ ID NO: 160) | QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161) |
| 20B9 | RVSQSIGANLA (SEQ ID NO: 162) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYIWPFT (SEQ ID NO: 164) |
| 14C11 | RASQSVSNLA (SEQ ID NO: 165) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161) |
| 21E11 | RASQSVGSDLA (SEQ ID NO: 166) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167) |

ES 2 904 593 T3

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|---------------------------|------------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| 49B11 | RASQNIQSDLA (SEQ ID NO: 168) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167) |
| 46E10 | RASQSVTSNFA (SEQ ID NO: 169) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161) |
| 12H6 | RASQGVSSNFA (SEQ ID NO: 170) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161) |
| 19A9 | RASQSVNRNLA (SEQ ID NO: 171) | GTSTRAT (SEQ ID NO: 172) | QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167) |
| 11B11 | RASQSVSTNFA (SEQ ID NO: 173) | GASTRAT (SEQ ID NO: 163) | QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161) |
| 21E7 | RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 174) | GSSTRAT (SEQ ID NO: 175) | QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167) |
| 12B2 17G11 | RASQSVINNLA (SEQ ID NO: 176) | GTSTRAT (SEQ ID NO: 172) | QDYNNWPFT (SEQ ID NO: 177) |
| 11F10 | RASQSVGSNLA (SEQ ID NO: 178) | GASTRASG (SEQ ID NO: 179) | QEYNNWPFT (SEQ ID NO: 180) |
| 29D5 | RANQIVSSNLA (SEQ ID NO: 181) | GTSTRAT (SEQ ID NO: 172) | QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167) |
| 30D8 | RSSQSLLHNKRNNYLD (SEQ ID NO: 182) | LASNRAS (SEQ ID NO: 183) | MQAQQTPIIT (SEQ ID NO: 184) |
| 20E12 32G8 | RSSQSLLYSNGKNYLD (SEQ ID NO: 185) | LGSNRAS (SEQ ID NO: 186) | MQAQQTPIIT (SEQ ID NO: 184) |
| 26B9 | RSSQSLLHRDGFNYLD (SEQ ID NO: 187) | LASSRAS (SEQ ID NO: 188) | MQALQTPIT (SEQ ID NO: 189) |
| 34E7 | RSTQSLLYSNGKNYLD (SEQ ID NO: 190) | LGSIRAS (SEQ ID NO: 191) | MQAQQTPIIT (SEQ ID NO: 184) |
| 20G5 | RSSQSLLYSDRRNYLD (SEQ ID NO: 192) | LGSYRAS (SEQ ID NO: 193) | MQALQIPIT (SEQ ID NO: 194) |
| C6 | SGSSNIGSNVYVY (SEQ ID NO: 195) | RNNQRPS (SEQ ID NO: 196) | AAWDDNLSGWV (SEQ ID NO: 197) |
| B5 | RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 198) | AASSLQS (SEQ ID NO: 199) | QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 200) |
| 20E12-1 32G8-1 | RSSQSLLYSX ₁ X ₂ KNYLD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 238) | LGSNRAS (SEQ ID NO: 186) | MQAQQTPIIT (SEQ ID NO: 184) |
| 26B9-1 | RSSQSLLHRX ₁ X ₂ FNYLD, en donde X ₁ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W, y X ₂ es R, H, K, D, E, S, T, N, Q, C, G, P, A, V, I, L, M, F, Y o W (SEQ ID NO: 239) | LASSRAS (SEQ ID NO: 188) | MQALQTPIT (SEQ ID NO: 189) |

La presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une y compite con el anticuerpo como se describe en esta memoria, incluyendo m62G7, h62G7, h62G7-H14/L1-DV, h62G7-EQ/L6, 42G9, 32A10, 20B9, 14C11, 21E11, 49B11, 46E10, 12H6, 19A9, 21E7, 11B11, 12B2, 11F10, 17G11, 29D5, 30D8, 20E12, 26B9, 32G8, 34E7, 20G5, C6, B5, 42G9-1, 32A10-1, 20B9-1, 14C11-1, 21E11-1, 49B11-1, 46E10-1, 12H6-1, 19A9-1, 21E7-1, 11B11-1, 12B2-1, 11F10-1, 17G11-1, 29D5-1, 30D8-1, 20E12-1, 26B9-1, 32G8-1, 34E7-1, 20G5-1, C6-1 y B5-1.

En algunas realizaciones, la invención también proporciona porciones de CDR de anticuerpos contra anticuerpos EGFRvIII basadas en regiones de contacto de CDR. Las regiones de contacto de CDR son regiones de un anticuerpo que imbuyen especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, las regiones de contacto de CDR incluyen las posiciones de los residuos en las CDRs y las zonas de Vernier que están restringidas con el fin de mantener la estructura de bucle adecuada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Véase, p. ej., Makabe et al., *J. Biol. Chem.*, 283:1156-1166, 2007. La determinación de las regiones de contacto de CDR está dentro del conocimiento de la técnica.

La afinidad de unión (K_D) del anticuerpo EGFRvIII tal como se describe en esta memoria para EGFRvIII (tal como EGFRvIII humano (p. ej., (SEQ ID NO: 201)) puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5000 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente cualquiera de 5000 nM, 4500 nM, 4000 nM, 3500 nM, 3000 nM, 2500 nM, 2000 nM, 1789 nM, 1583 nM, 1540 nM, 1500 nM, 1490 nM, 1064 nM, 1000 nM, 933 nM, 894 nM, 750 nM, 705 nM, 678 nM, 532 nM, 500 nM, 494 nM, 400 nM, 349 nM, 340 nM, 353 nM, 300 nM, 250 nM, 244 nM, 231 nM, 225 nM, 207 nM, 200 nM, 186 nM, 172 nM, 136 nM, 113 nM, 104 nM, 101 nM, 100 nM, 90 nM, 83 nM, 79 nM, 74 nM, 54 nM, 50 nM, 45 nM, 42 nM, 40 nM, 35 nM, 32 nM, 30 nM, 25 nM, 24 nM, 22 nM, 20 nM, 19 nM, 18 nM, 17 nM, 16 nM, 15 nM, 12 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7,5 nM, 7 nM, 6,5 nM, 6 nM, 5,5 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,01 nM o 0,001 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor que aproximadamente cualquiera de 5000 nM, 4000 nM, 3000 nM, 2000 nM, 1000 nM, 900 nM, 800 nM, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7,5 nM, 7 nM, 6,5 nM, 6 nM, 5 nM, 4,5 nM, 4 nM, 3,5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM o 0,5 nM.

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, utilizando los anticuerpos descritos en esta memoria. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210, 1986). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, *Nature* 305, 537-539, 1983). Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana (p. ej., EGFRvIII) y que comprende un segundo dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmunitaria humana.

La célula efectora inmunitaria humana puede ser cualquiera de una diversidad de células efectoras inmunitarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, la célula efectora inmunitaria puede ser un miembro del linaje de células linfoides humanas, que incluye, pero no se limita a una célula T (p. ej., una célula T citotóxica), una célula B y una célula asesina natural (NK). La célula efectora inmunitaria también puede ser, por ejemplo, sin limitación, un miembro del linaje mielóide humano, que incluye, pero no se limita a un monocito, un granulocito neutrofílico y una célula dendrítica. Células efectoras inmunitarias de este tipo pueden tener un efecto citotóxico o apoptótico sobre una célula diana u otro efecto deseado tras la activación mediante la unión de un antígeno efector.

El antígeno efector es un antígeno (p. ej., una proteína o un polipéptido) que se expresa en la célula efectora inmunitaria humana. Ejemplos de antígenos efectores que pueden unirse mediante la proteína heterodimérica (p. ej., un anticuerpo heterodimérico o un anticuerpo biespecífico) incluyen, pero no se limitan a, CD3 humano (o complejo CD3 (Cúmulo de Diferenciación)), CD16, NKG2D, NKp46, CD2, CD28, CD25, CD64 y CD89.

La célula diana puede ser una célula nativa o ajena a los seres humanos. En una célula diana nativa, la célula puede haberse transformado para ser una célula maligna o puede haberse modificada patológicamente (p. ej., una célula diana nativa infectada con un virus, un plasmodio o una bacteria). En una célula diana extraña, la célula es un patógeno invasor, tal como una bacteria, un plasmodio o un virus.

El antígeno diana se expresa en una célula diana en una afección enferma (p. ej., una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa (p. ej., cáncer), un trastorno inmunológico, una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa (p. ej., una infección viral o una infección parasitaria), una reacción alérgica, una enfermedad de injerto frente a huésped o una enfermedad de huésped frente a injerto). Un antígeno diana no es un antígeno efector. En realizaciones de la invención, el antígeno diana es EGFRvIII.

En algunos ejemplos se proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana y que comprende un segundo dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmunitaria humana, en donde el primer dominio variable de anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende un CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 202, 203, 204,

205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217 o 218; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 211, 212, 213 o 215.

5 En algunos ejemplos se proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana y que comprende un segundo dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmunitaria humana, en donde el primer dominio variable de anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH, que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 143, 144 o 145; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 105, 106, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 135, 136, 140, 141, 146, 147, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235 o 237; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 67, 72, 73, 79, 85, 104, 107, 108, 114, 120, 126, 129, 142, 148, 219, 220, 221, 222, 223 o 236; y/o (b) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 149, 154, 156, 159, 162, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 176, 178, 181, 182, 185, 187, 190, 192, 195, 198, 238 o 239; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 150, 152, 155, 157, 160, 163, 172, 175, 179, 183, 186, 188, 191, 193, 196 o 199; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 151, 153, 158, 161, 164, 167, 177, 180, 184, 189, 194, 197 o 200.

25 En algunos ejemplos, el segundo dominio variable de anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH de la secuencia VH mostrada en SEQ ID NO: 240; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL de la secuencia VL mostrada en SEQ ID NO: 241.

30 En algunas realizaciones, el segundo dominio variable de anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 244, 110 o 245; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 246 o 247; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 248; y/o (b) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 249; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 250; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 251.

40 La Tabla 3 muestra las secuencias específicas de aminoácidos y ácidos nucleicos del segundo dominio variable de anticuerpo, que es específico para CD3. En la Tabla 3, las secuencias subrayadas son secuencias de CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia.

Tabla 3

| mAb | Cadena Ligera | Cadena Pesada |
|--------------------------|--|---|
| h2B4_HNPS_VH 1d_T2 4K_VL | <p>DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQSLFNVRSRKNYLAWYQQK PGQPPKLLISWASTRESGVVDRF SSGSGTDFLTLISSLQAEDVAV YYCKQSYDLFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 241)</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCA ASGFTFSDYYMTWVRQAPGKGLE WVAFIRNRARGYTSDHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRPSYYVLDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 240)</p> |
| h2B4_HNPS_VH 1d_T2 4K_VL | <p>GACATTGTGATGACTCAATCCC CCGACTCCCTGGCTGTGTCCCT CGCGAACCGCGCAACTATCAAC TGTAAAGCAGCCAGTCCCTGT TCAACGTCGGTCGAGGAGAA CTACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGGCAGCCGCCGAAG CTTCTGATCTCATGGCCTCAA CTCGGAAAGCGGAGTGCCAG ATAGATTCTCCGGATCTGGCTC CGGAACCGACTTCACCCCTGACG ATTTGAGCTTGCAAGCGGAGG ATGTGGCCGTGTACTACTGCAA GCAGTCCTACGACCTCTTCACC TTTGGTTCGGGCACCAAGCTGG AGATCAA (SEQ ID NO: 243)</p> | <p>GAAGTCCAACCTTGTGCAATCGGG AGGAGCCCTGTGCAACCCCGGT GGATCCCTGAGGCTGTATGCGG CGGCCTCGGGCTTACACCTTTTCC GATTACTACATGACCTGGGTGAG ACAGGCCCTGGAAGGGGTTG GAATGGGTGGCATTTCATCCGGA ATAGAGCCCGCGGATACACTTCC GACCACAACCCAGCGTGAAGG GCGGGTTCACCATTAGCCGCGA CAACGCCAAGAAGTCCCTCTACC TCCAAATGAACAGCCTGCGGGC GGAGGATACCGCTGTGTACTACT GCGCCCGCAGCCGCGCTCCTA CTATGTGCTGGACTACTGGGGC CAGGGTACTACGGTACCCGCTCT CCTCA (SEQ ID NO: 242)</p> |

La Tabla 4 muestra los ejemplos de secuencias de CDR del segundo dominio variable de anticuerpo, que es específico para CD3.

Tabla 4

5

| Cadena Pesada | | | |
|----------------------|--|--|--------------------------------|
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| h2B4_H NPS | SDYYMT (SEQ ID NO: 244) (Kabat); GFTFSD (SEQ ID NO: 110) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 245) (Extendida) | FIRNRARGYTSDH (SEQ ID NO: 246) (Kabat) FIRNRARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO: 247) (Extendida) | DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 248) |
| Cadena Ligera | | | |
| mAb | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 |
| h2B4- 1d_T24 K | KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 249) | WASTRES (SEQ ID NO: 250) | KQSYDLFT (SEQ ID NO: 251) |

10 En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico proporcionado en esta memoria que contiene un dominio variable específico para CD3 contiene una secuencia anti-CD3 tal como se proporciona en la Publicación de EE. UU. N° 20160297885.

15 De acuerdo con un enfoque para producir anticuerpos biespecíficos, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de la región constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para
20 ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como
25 resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen una importancia particular.

30 En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación PCT N° WO 94/04690.

35 En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de modificación de aminoácidos en la primera región de bisagra en un brazo, y el aminoácido sustituido/reemplazado en la primera región de bisagra tiene una carga opuesta al aminoácido correspondiente en la segunda región de bisagra en otro brazo. Este enfoque se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

40 En otro enfoque, la formación de una proteína heteromultimérica o heterodimérica deseada (p. ej., anticuerpo biespecífico) se potencia alterando o modificando una interfaz entre una primera y una segunda región Fc similar a inmunoglobulina (p. ej., una región bisagra y/o una región CH3). En este enfoque, los anticuerpos biespecíficos pueden estar compuestos por una región CH3, en donde la región CH3 comprende un primer polipéptido CH3 y un segundo polipéptido CH3 que interactúan para formar una interfaz CH3, en donde uno o más aminoácidos dentro de la interfaz CH3 desestabilizan la formación del homodímero y no son electrostáticamente desfavorables para la
45 formación del homodímero. Este enfoque se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar utilizando una etiqueta de péptido que contiene glutamina modificada para el anticuerpo dirigido a un epítipo (p. ej., EGFRvIII) en un brazo y otra etiqueta de péptido

(p. ej., una etiqueta de péptido que contiene Lys o una Lys endógena reactiva) modificado para un segundo anticuerpo dirigido a un segundo epítipo en otro brazo en presencia de transglutaminasa. Este enfoque se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

- 5 En algunas realizaciones, la proteína heterodimérica (p. ej., anticuerpo biespecífico) tal como se describe en esta memoria comprende un anticuerpo humano de longitud completa, en donde un primer dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico se une específicamente a un antígeno diana (p. ej., EGFRvIII), y comprende un segundo dominio variable de anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana al unirse específicamente a un antígeno efector (p. ej., CD3) ubicado en la célula efectora inmunitaria humana, en donde el primer y segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225 y 228 (p. ej., (C223E o C223R), (E225R) y (P228E o P228R)) en la región de bisagra y en la posición 409 o 368 (p. ej., K409R o L368E (esquema de numeración de la UE)) en la región CH3 de IgG2 humana (SEQ ID NO: 290).
- 10
- 15 En algunas realizaciones, el primer y el segundo dominios variables de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 221 y 228 (p. ej., (D221R o D221E) y (P228R o P228E)) en la región de bisagra y en la posición 409 o 368 (p. ej. K409R o L368E (esquema de numeración de la UE)) en la región CH3 de la IgG1 humana (SEQ ID NO: 291).
- 20 En algunas realizaciones, el primer y el segundo dominios variables de anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en la posición 228 (p. ej. (P228E o P228R)) en la región de bisagra y en la posición 409 o 368 (p. ej., R409 o L368E (esquema de numeración de la UE)) en la región CH3 de la IgG4 humana (SEQ ID NO: 292).
- 25 La secuencia de aminoácidos de las regiones Fc de tipo salvaje de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas se enumeran a continuación:

IgG2 (SEQ ID NO: 290)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPKPPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
30 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 (SEQ ID NO: 291)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
35 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO: 292)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
40 RLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo (p. ej., un dominio de anticuerpo), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas realizaciones, el anticuerpo EGFRvIII descrito en esta memoria es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo EGFRvIII es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal quimérico.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como, por ejemplo sin limitación, una región constante que tiene un potencial incrementado para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la región constante puede estar modificada para tener una afinidad incrementada por un receptor Fc gamma, tal como, p. ej., FcγRI, FcγRIIA o FcγRIII.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del Reino Unido N° 98099518. El Fc puede ser IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana. El Fc puede ser IgG2 humana que contiene la mutación A330P331 a S330S331 (IgG2Δa), en la que los residuos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG4 que comprende las siguientes mutaciones (Armour et al., Molecular Immunology 40 585-593, 2003): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4Δc), en la que la numeración se refiere a la IgG4 de tipo salvaje. En aún otra realización, el Fc es IgG4 humana E233F234L235 a P233V234A235 con delección G236 (IgG4Δb). En otra realización, el Fc es cualquier Fc de IgG4 humana (IgG4, IgG4Δb o IgG4Δc) que contiene la mutación estabilizadora de bisagra S228 a P228 (Aalberse et al., Immunology 105, 9-19, 2002). En otra realización, el Fc puede ser Fc aglicosilado.
- 20 En algunas realizaciones, la región constante se aglicosila mutando el residuo de fijación de oligosacáridos (tal como Asn297) y/o los residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de glicosilación en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante se aglicosila para la glicosilación ligada a N enzimáticamente. La región constante se puede aglicosilar para la glicosilación ligada a N enzimáticamente o mediante expresión en una célula huésped deficiente en glicosilación.
- 25 En algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que elimina o reduce la unión al receptor de Fc gamma. Por ejemplo, el Fc puede ser IgG2 humana que contiene la mutación D265, en la que los residuos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 290). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 252:

35 **ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRCRVRCPRCPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHGDWLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.**

El ácido nucleico que codifica la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 252) se muestra en SEQ ID NO: 253:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
GTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCT
CCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTCGTGTCAGGTGCCCAAGGTG
CCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGCCGTG
AGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGA
GATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAGGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA.

5 En algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 254:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

10 El ácido nucleico que codifica la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 254) se muestra en SEQ ID NO: 255:

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
 TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
 GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA
 CACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTGAGGTTCGAGTGCCCAGAGTG
 CCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGCCGTG
 AGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGG
 TCAGCGTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
 GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC
 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGA
 GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
 ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCG
 TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA.

5 El aminoácido de la región constante Kappa humana se muestra en SEQ ID NO: 256:

GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC. Y el ácido nucleico que codifica la
 secuencia de SEQ ID NO: 256) se muestra en SEQ ID NO: 257:

10 GGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
 AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG.

15 Un modo de determinar la afinidad de unión de anticuerpos a EGFRvIII es midiendo la afinidad de unión del
 anticuerpo bivalente a la proteína EGFRvIII monomérica. La afinidad de un anticuerpo EGFRvIII se puede
 determinar mediante resonancia de plasmón de superficie (sistema de resonancia de plasmón de superficie (SPR)
 Biacore™ 3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipado con Fc anti-ratón pre-inmovilizado o Fc anti-humano
 utilizando tampón de desarrollo HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%
 v/v). El dominio extracelular de EGFRvIII humano marcado con 8-histidina monomérico se puede diluir en tampón
 HBS-EP a una concentración de menos de 0,5 µg/mL e inyectar a través de los canales de chip individuales
 20 utilizando tiempos de contacto variables, para lograr dos intervalos de densidad de antígeno, ya sea 50- 200
 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados u 800-1.000 RU para ensayos de rastreo. Los
 estudios de regeneración han demostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v elimina eficazmente la proteína

EGFRvIII unida, al tiempo que mantiene la actividad de los anticuerpos EGFRvIII en el chip durante más de 200 inyecciones. Típicamente, diluciones en serie (concentraciones que abarcan 0,1-10x K_D estimado) de muestras de EGFRvIII purificado marcadas con 8-histidina se inyectan durante 1 min a razón de 100 μ L/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas EGFRvIII se determinan mediante absorbancia a 280 nm basándose en el coeficiente de extinción específico para la secuencia de la proteína EGFRvIII marcada con 8-histidina. Las velocidades de asociación cinética (k_{on} o k_a) y las velocidades de disociación (k_{off} o k_d) se obtienen simultáneamente ajustando los datos globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) utilizando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier EGFRvIII monomérico, incluyendo EGFRvIII humano, EGFRvIII de otro mamífero (tal como EGFRvIII de ratón, EGFRvIII de rata o EGFRvIII de primates), así como diferentes formas de EGFRvIII (p. ej., EGFRvIII glicosilado). La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25°C, pero también se puede medir a 37°C.

Los anticuerpos tal como se describen en esta memoria se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la vía y el programa de inmunización del animal huésped están generalmente de acuerdo con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, tal como se describe adicionalmente en esta memoria. Técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y/o se describen en esta memoria.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpos de los mismos, puede ser manipulado para que sirva como base para la producción de líneas celulares de mamíferos, incluyendo seres humanos y de hibridoma. Típicamente, el animal huésped es inoculado por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en esta memoria.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de los linfocitos y células de mieloma inmortalizadas utilizando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C., *Nature* 256:495-497, 1975 o de acuerdo con lo modificado por Buck, D.W., et al., *In Vitro*, 18:377-381, 1982. Líneas de mieloma disponibles, que incluyen pero no se limitan a X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE. UU., pueden utilizarse en la hibridación. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides utilizando un fusógeno tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio hipoxantina aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en esta memoria, complementados con o sin suero, puede utilizarse para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden utilizar células B inmortalizadas con EBV para producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se analizan para determinar la actividad anti-inmunógena mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (p. ej., radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que pueden utilizarse como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenitoras de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para EGFRvIII, o porciones de los mismos.

Hibridomas que producen anticuerpos de este tipo pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse del medio de cultivo o de los fluidos corporales mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, haciendo pasar la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno fijado a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con células que expresan EGFRvIII humano, una proteína EGFRvIII humana o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunogénica en la especie que se ha de inmunizar, p. ej., hemocianina de lapa bocallave, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en que R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y la secuencia de polinucleótidos puede luego clonarse en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular se puede llevar a cabo mediante la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Tiller et al., *J. Immunol. Methods* 329, 112, 2008; Pat. de EE. UU. N° 7.314.622.

Como alternativa, la secuencia de polinucleótidos puede utilizarse para la manipulación genética para «humanizar» el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para que se parezca más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si el anticuerpo se utiliza en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad por EGFRvIII y una mayor eficacia en la inhibición de EGFRvIII.

Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos pronosticada de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida, (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización, (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se ha descrito un cierto número de moléculas de anticuerpos «humanizadas» que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus CDRs asociadas condensadas a regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299, 1991, Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224, 1989, Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538, 1987 y Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583, 1987. Otras referencias describen CDRs de roedor injertadas en una región marco (FR) de soporte humana antes de la fusión con una región constante de anticuerpo humana apropiada. Véase, por ejemplo, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327, 1988, Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536, 1988 y Jones et al. *Nature* 321:522-525, 1986. Otra referencia describe CDRs de roedor soportadas por regiones marco de roedor modificadas por ingeniería recombinante. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas «humanizadas» están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpos anti-humanos de roedores que limitan la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo se puede modificar de manera que sea inmunológicamente inerte (p. ej., no desencadena la lisis del complemento). Véase, p. ej., la publicación PCT N° PCT/GB99/01441; Solicitud de Patente del Reino Unido N° 9809951.8. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse se describen por Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476, 1991, y en las Pat. de EE. UU. N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación PCT N° WO 01/27160.

Los principios generales relacionados con los anticuerpos humanizados arriba comentados también son aplicables a la personalización de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además, pueden combinarse uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., injerto de CDR, mutación de marco y mutación de CDR.

En una variación, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos utilizando ratones disponibles comercialmente que han sido modificados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. Animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmunitaria más deseable (p. ej., anticuerpos completamente humanos) o respuesta inmunitaria más robusta también pueden utilizarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de una tecnología de este tipo son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Como alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante y expresarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden producir de forma recombinante mediante tecnología de presentación en fagos. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994. Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553, 1990) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios del gen del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos se puede realizar en una diversidad de formatos; para una revisión, véase, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993. Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la presentación de fagos. Clackson et al., *Nature* 352: 624-628, 1991, aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña selección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo los auto-antígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, o Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993. En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a un ritmo elevado (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y las células B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y diferencian

- preferentemente durante el enfrentamiento posterior al antígeno. Este proceso natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "mezcla de cadenas". (Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783, 1992). En este método, la afinidad de anticuerpos humanos «primarios» obtenidos por presentación de fagos se puede mejorar reemplazando secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera por repertorios de variantes (repertorios) que se producen de forma natural de genes del dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo pM-nM. Se ha descrito una estrategia para producir repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocida como "la madre de todas las colecciones") por Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266, 1993. La mezcla de genes también puede utilizarse para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, en que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, al que también se le alude como "impresión de epítipo", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedores obtenido mediante la técnica de presentación en fagos se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creando quimeras roedor-ser humano. La selección del antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión al antígeno funcional, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del participante. Cuando se repite el proceso con el fin de reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la Publicación PCT N° WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de marco o de CDR de origen roedor.
- Los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante aislando primero los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, obteniendo la secuencia del gen y utilizando la secuencia del gen para expresar el anticuerpo de manera recombinante en las células huésped (p. ej., células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (p. ej., tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756, 2001; Lonberg, N. y D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65, 1995; y Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147, 1999. Se conocen en la técnica métodos para preparar derivados de anticuerpos, p. ej., humanizados, de cadena sencilla, etc.
- También pueden emplearse inmunoensayos y técnicas de clasificación por citometría de flujo tales como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para EGFRvIII, o antígenos tumorales de interés.
- Los anticuerpos tal como se describen en esta memoria se pueden unir a muchos soportes diferentes. Los soportes pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de soportes bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del soporte puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros soportes adecuados para unir anticuerpos, o serán capaces de determinarlos utilizando una experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, el soporte comprende un resto que fija como objetivo el miocardio.
- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de un ADN de este tipo. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión (tales como los vectores de expresión descritos en la Publicación PCT N° WO 87/04462), que luego se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, p. ej., la Publicación PCT N° WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de las regiones constantes de la cadena ligera y pesada humana en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, 1984, o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal de esta memoria.
- Los anticuerpos EGFRvIII tal como se describen en esta memoria pueden identificarse o caracterizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, con lo que se detecta y/o mide la reducción de los niveles de expresión de EGFRvIII. En algunas realizaciones, un anticuerpo EGFRvIII se identifica incubando un agente candidato con EGFRvIII y vigilando la unión y/o la reducción concomitante de los niveles de expresión de EGFRvIII. El ensayo de unión se puede realizar con polipéptido(s) EGFRvIII purificado(s), o con células que expresan naturalmente, o transfectadas para expresar polipéptido(s) EGFRvIII. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo EGFRvIII conocido por la unión a EGFRvIII. El ensayo se puede realizar en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA.
- Después de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo EGFRvIII candidato puede confirmarse y refinarse adicionalmente mediante bioensayos, conocidos por testar las actividades biológicas fijadas como objetivo.

Alternativamente, se pueden utilizar bioensayos para rastrear candidatos directamente. Algunos de los métodos para identificar y caracterizar anticuerpos se describen en detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos EGFRvIII se pueden caracterizar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al que se une, o "mapeo de epítipos". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la ubicación de epítipos en proteínas, incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos basados en péptidos sintéticos, tal como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítipos se puede utilizar para determinar la secuencia a la que un anticuerpo se une. El mapeo de epítipos está disponible comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhartweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un solo tramo de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que no necesariamente puede estar contenido en un solo tramo. Pueden aislarse o sintetizarse péptidos de diferentes longitudes (p. ej., de al menos 4-6 aminoácidos de longitud) (p. ej., de forma recombinante) y utilizarse para ensayos de unión con un EGFRvIII u otro anticuerpo antígeno tumoral. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo EGFRvIII se puede determinar en un rastreo sistemático utilizando péptidos solapantes derivados de la secuencia de EGFRvIII y determinando la unión por el anticuerpo EGFRvIII. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica EGFRvIII se fragmenta al azar o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de EGFRvIII con el anticuerpo que se ha de testar. Los fragmentos de genes pueden, por ejemplo, producirse mediante PCR y luego transcribirse y traducirse en proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo al EGFRvIII marcado radiactivamente se determina luego mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Determinados epítipos también pueden identificarse utilizando grandes colecciones de secuencias de péptidos aleatorias presentadas en la superficie de las partículas de fagos (fagotecas). Alternativamente, se puede testar una colección definida de fragmentos de péptidos solapantes para determinar la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, se pueden realizar la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de escaneo de alanina para identificar los residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítipo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden realizar utilizando un EGFRvIII mutante en el que se han reemplazado (intercambiado) diversos fragmentos de la proteína EGFRvIII con secuencias de EGFRvIII de otra especie (p. ej., ratón), o una proteína estrechamente relacionada, pero antigénicamente distinta (p. ej., Trop-1). Evaluando la unión del anticuerpo al EGFRvIII mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento de EGFRvIII particular para la unión del anticuerpo. En el caso de un anticuerpo específico para EGFRvIII (es decir, un anticuerpo que no se une a EGFRwt (tipo salvaje) ni a ninguna otra proteína), el epítipo se puede deducir del alineamiento de secuencia de EGFRvIII a EGFRwt.

Todavía otro método que puede utilizarse para caracterizar un anticuerpo EGFRvIII es utilizar ensayos de competencia con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos en EGFRvIII, para determinar si el anticuerpo EGFRvIII se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos de competencia.

Puede utilizarse un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo EGFRvIII. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, p. ej., las Pat. de EE. UU. N^os 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por cateterismo y administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco o ganglio simpático, o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También se puede utilizar el suministro fijado como objetivo de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Técnicas de suministro de ADN mediadas por receptor se describen, por ejemplo, en Findeis et al., *Trends Biotechnol.*, 1993, 11: 202; Chiou y col., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer*, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 263:621, 1988; Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 269:542, 1994; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3655, 1990; y Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 266:338, 1991. Composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También se pueden utilizar intervalos de concentraciones de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos se pueden administrar utilizando vehículos de suministro de genes. El vehículo de suministro de genes puede ser de origen viral o no viral (véase, en general, Jolly, *Cancer Gene Therapy*, 1:51, 1994; Kimura, *Human Gene Therapy*, 5:845, 1994; Connelly, *Human Gene Therapy*, 1995, 1:185; y Kaplitt, *Nature Genetics*, 6:148, 1994). La expresión de secuencias codificantes de este tipo se puede inducir utilizando promotores endógenos de mamíferos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

5 Vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Vehículos basados en virus ejemplares incluyen, pero no se limitan a retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT N^os WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las Pat. de EE. UU. N^os 5.219.740 y 4.777.127; Patente GB N^o 2.200.651; y Pat. EP N^o 0 345 242), vectores basados en alfavirus (p. ej., vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR -532)) y vectores de virus adeno-asociados (AAV) (véanse, p. ej., las Publicaciones PCT N^os WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración de ADN enlazado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.

15 También se pueden emplear vehículos y métodos de suministro no virales, que incluyen, pero no se limitan a ADN condensado policatiónico enlazado o no enlazado a adenovirus muertos solo (véase, p. ej., Curiel, Hum. Gene Ther., 3:147, 1992); ADN enlazado a ligando (véase, p. ej., Wu, J. Biol. Chem., 264:16985, 1989); células vehículos de células eucarióticas (véanse, p. ej., la Pat. de EE. UU. N^o 5.814.482; las Publicaciones PCT N^os WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Se describen métodos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la Publicación PCT N^o WO 90/11092 y la Pat. de EE. UU. N^o 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes se describen en la Pat. de EE. UU. N^o 5.422.120; Publicaciones PCT N^os WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y documento EP 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell Biol., 14:2411, 1994 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581, 1994.

25 En algunas realizaciones, la invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos descritos en esta memoria o producidos mediante los métodos y que tienen las características descritas en esta memoria. Tal como se utiliza en esta memoria, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a EGFRVIII, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender, además, excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son bien conocidos en la técnica.

30 La invención también proporciona métodos para producir cualquiera de estos anticuerpos. Los anticuerpos de esta invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse mediante degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante métodos recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) tal como se describe arriba o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse mediante un sintetizador de polipéptidos automático empleando el método en fase sólida. Véanse también, las Pat. de EE. UU. N^os 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415.

40 En otra alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo m62G7, h62G7, h62G7-H14/L1-DV, h62G7-EQ/L6, 42G9, 32A10, 20B9, 14C11, 21E11, 49B11, 46E10, 12H6, 19A9, 21E7, 11B11, 12B2, 11F10, 17G11, 29D5, 30D8, 45 20E12, 26B9, 32G8, 34E7, 20G5, C6, B5, 42G9-1, 32A10-1, 20B9-1, 14C11-1, 21E11-1, 49B11-1, 46E10-1, 12H6-1, 19A9-1, 21E7-1, 11B11-1, 12B2-1, 11F10-1, 17G11-1, 29D5-1, 30D8-1, 20E12-1, 26B9-1, 32G8-1, 34E7-1, 20G5-1, C6-1 o B5-1. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para uso futuro. Los vectores (incluyendo los vectores de expresión) y las células huésped se describen con más detalle en esta memoria.

50 Anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la invención. Anticuerpos de este tipo se han utilizado para fijar como objetivo células del sistema inmunológico a células no deseadas (Pat. de EE. UU. n^o 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (Publicaciones PCT N^os WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Agentes y técnicas de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Pat. de EE. UU. N^o 4.676.980.

60 Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

65 En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción Fcy puede modificarse para evitar la interacción con el receptor Fcy y el complemento y los sistemas inmunitarios. Las técnicas para la preparación de anticuerpos de este tipo se describen en el documento WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para que se parezca más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si el anticuerpo se utiliza en

ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N°s 5.997.867 y 5.866.692.

5 La invención abarca modificaciones de los anticuerpos y polipéptidos de la invención, incluyendo variantes que se muestran en la Tabla 5, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y variantes que tienen actividad y/o afinidad potenciada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos se puede mutar para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a EGFRvIII. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario que se describa en detalle en esta memoria. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de
10 residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de manera perjudicial la actividad funcional, o que maduran (potencian) la afinidad del polipéptido por su ligando, o uso de análogos químicos.

15 Inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo condensado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

20 Variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones del FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservadoras". Si sustituciones de este tipo dan
25 como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados «sustituciones ejemplares» en la Tabla 5, o como se describe más adelante con referencia a clases de aminoácidos, y se pueden rastrear los productos. En algunas realizaciones, las variantes de sustitución de los anticuerpos proporcionados en esta memoria no tienen más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución conservadora en la región VH o VL en comparación con el anticuerpo precursor de referencia. En
30 realizaciones de la invención, las sustituciones no están dentro de una CDR de la región VH o VL.

Tabla 5: Sustituciones de Aminoácidos

| Residuo Original (aminoácido que se produce de forma natural) | Sustituciones Conservadoras | Sustituciones Ejemplares |
|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| Ala (A) | Val | Val; Leu; Ile |
| Arg (R) | Lys | Lys; Gln; Asn |
| Asn (N) | Gln | Gln; His; Asp, Lys; Arg |
| Asp (D) | Glu | Glu; Asn |
| Cys (C) | Ser | Ser; Ala |
| Gln (Q) | Asn | Asn; Glu |
| Glu (E) | Asp | Asp; Gln |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Arg | Asn; Gln; Lys; Arg |
| Ile (I) | Leu | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina |
| Leu (L) | Ile | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg | Arg; Gln; Asn |
| Met (M) | Leu | Leu; Phe; Ile |
| Phe (F) | Tyr | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |

| Residuo Original (aminoácido que se produce de forma natural) | Sustituciones Conservadoras | Sustituciones Ejemplares |
|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| Trp (W) | Tyr | Tyr; Phe |
| Tyr (Y) | Phe | Trp; Phe; Thr; Ser |
| Val (V) | Leu | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina |

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos de aminoácidos que se producen de forma natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) De carácter ácido (cargados negativamente): Asp, Glu;
- (4) De carácter básico (cargados positivamente): Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se realizan intercambiando un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. En algunos ejemplos, no se realizan más de una a cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. En otros ejemplos, no se realizan más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. Todavía en otros ejemplos, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Modificaciones incluyen también polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.* 65:111-128, 1997; Wright y Morrison, *TibTECH* 15:26-32, 1997). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318, 1996; Wittwe y Howard, *Biochem.* 29:4175-4180, 1990) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que puede afectar a la conformación y presenta una superficie tridimensional de la glicoproteína (Jefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416, 1996). Los oligosacáridos también pueden servir para fijar como objetivo una glicoproteína dada a determinadas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectante, tienen una actividad ADCC mejorada (Umana et al., *Mature Biotech.* 17:176-180, 1999).

La glicosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-

acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

5 La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos arriba descritas (para los sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación ligados a O).

10 El patrón de glicosilación de los anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, p. ej., anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales rara vez es la célula nativa, se pueden esperar variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, p. ej., Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070, 1997).

15 Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular, incluyendo la introducción o sobre-expresión de determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Pat. de EE. UU. N°s 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, se pueden eliminar enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, utilizando endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante puede modificarse mediante ingeniería genética para que sea defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

25 Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden utilizarse modificaciones, por ejemplo, para la fijación de etiquetas para inmunoensayo. Los polipéptidos modificados se preparan utilizando procedimientos establecidos en la técnica y se pueden rastrear utilizando ensayos estándares conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen más adelante y en los Ejemplos.

30 Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación PCT N° WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa o la destrucción de la diana mediada por células. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios de la cadena pesada C_H2 de inmunoglobulina humana. Anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para uso en la terapia crónica con anticuerpos, para evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional con anticuerpos.

45 La invención incluye realizaciones maduradas por afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la técnica (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783, 1992; Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994; Schier et al., Gene, 169:147-155, 1995; Yelton et al., J. Immunol., 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., J. Immunol., 154(7):3310-9, 1995; Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896, 1992; y Publicación PCT N° WO2004/058184).

50 Los siguientes métodos pueden utilizarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina "mutagénesis de exploración de colecciones". Generalmente, la mutagénesis de exploración de colecciones funciona de la siguiente manera. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan por dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos utilizando métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas colecciones de clones (en algunas realizaciones, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada una de las posiciones). Generalmente, la colección también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, p. ej., aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la colección), de cada una de las colecciones se rastrean para determinar la afinidad de unión al polipéptido diana (u otra diana de unión), y se identifican candidatos con una unión incrementada, con la misma o disminuida, o sin unión. Métodos para determinar la afinidad de unión son bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión se puede determinar utilizando análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore™, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o más. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo, una K_D de aproximadamente 10 nM o menor. El rastreo utilizando resonancia de plasmón de superficie Biacore™ se describe en los Ejemplos en esta memoria.

65

La afinidad de unión se puede determinar utilizando Kinexa Biocensor, ensayos de centelleo de proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o presentación de levaduras. La afinidad de unión también se puede rastrear utilizando un bioensayo adecuado.

5 En algunos ejemplos, cada una de las posiciones de aminoácidos en una CDR se reemplaza (en algunos ejemplos, una a la vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando métodos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en esta memoria). Esto genera pequeñas colecciones de clones (en algunos ejemplos, uno por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si se sustituyen todos los 20 aminoácidos en cada una de las posiciones).

10 En algunos ejemplos, la colección a rastrear comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDRs. Por lo tanto, la colección puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La colección puede comprender sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDRs. La colección puede comprender sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, encontrándose dichas posiciones en dos, 15 tres, cuatro, cinco o seis CDRs. La sustitución se puede preparar utilizando codones de baja redundancia. Véase, p. ej., la Tabla 2 de Balint et al., Gene 137(1):109-18, 1993.

20 La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3. La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Los candidatos con unión mejorada pueden secuenciarse, identificando con ello un mutante de sustitución de CDR que da como resultado una afinidad mejorada (también denominada una sustitución "mejorada"). Los candidatos que se unen también pueden secuenciarse, identificando con ello una sustitución de CDR que retiene la unión.

25 Se pueden realizar múltiples rondas de rastreo. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda colección que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada una de las posiciones de CDR mejorada (es decir, la posición del aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución 30 mostró una unión mejorada). La preparación y el rastreo o selección de esta colección se comentan más adelante.

La mutagénesis de escaneo de colecciones también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o sin unión también proporcionan información relacionada con la importancia de cada una de las posiciones de aminoácidos para la 35 estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR conserva la unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es poco probable que sea necesaria para la unión del antígeno. Por el contrario, si una posición de CDR conserva la unión en solo un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de CDR. Por lo tanto, los métodos de mutagénesis de escaneo de colecciones generan información con respecto a las 40 posiciones en las CDRs que se pueden cambiar a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y las posiciones en las CDRs que no se pueden cambiar o que solo se pueden cambiar a unos pocos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada se pueden combinar en una segunda colección, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y puede incluir, además, sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la colección que se desee o permita. utilizando el método de rastreo o selección deseado. Además, si se desea, la posición de los aminoácidos adyacentes se puede aleatorizar a al menos dos o 45 más aminoácidos. La aleatorización de los aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, lo que a su vez puede permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La colección también puede comprender sustitución en posiciones que no mostraron una afinidad mejorada en la primera ronda de rastreo.

50 La segunda colección se rastrea o selecciona en cuanto a miembros de la colección con afinidad de unión mejorada y/o alterada utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo el rastreo utilizando el análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore™, y la selección utilizando cualquier método conocido en la técnica para la selección, incluyendo la presentación de fagos. La presentación de levaduras y la presentación de ribosomas.

55 La invención también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de esta invención. En un ejemplo, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, 51, 211, 212, 213 o 215 y/o al menos 10 aminoácidos de 60 la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217 o 218. En otros ejemplos, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena ligera y/o al menos 65 aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena pesada. En otro

ejemplo, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR(s). Todavía en otros ejemplos, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (VH CDR3) y/o CDR L3 (VL CDR3). Para los fines de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no está fijada en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una "etiqueta" tal como una etiqueta FLAG o una etiqueta 6His. Las etiquetas son bien conocidas en la técnica.

Puede crearse un polipéptido de fusión mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de esta invención se producen preparando y expresando un polinucleótido que las codifica utilizando métodos recombinantes descritos en esta memoria, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la síntesis química.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, ligados) a un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). En aras de la simplicidad, se hará referencia en general a anticuerpos con el entendimiento de que estos métodos se aplican a cualquiera de las realizaciones de anticuerpos EGFRvIII descritas en esta memoria. La conjugación se refiere generalmente a enlazar estos componentes tal como se describe en esta memoria. El enlace (que generalmente fija estos componentes en asociación próxima al menos para la administración) se puede lograr de un cierto número de formas. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (p. ej., un haluro) en el otro.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la invención y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas), que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: m62G7, h62G7, h62G7-H14/L1-DV, h62G7-EQ/L6, 42G9, 32A10, 20B9, 14C11, 21E11, 49B11, 46E10, 12H6, 19A9, 21E7, 11B11, 12B2, 11F10, 17G11, 29D5, 30D8, 20E12, 26B9, 32G8, 34E7, 20G5, C6, B5, 42G9-1, 32A10-1, 20B9-1, 14C11-1, 21E11-1, 49B11-1, 46E10-1, 12H6-1, 19A9-1, 21E7-1, 11B11-1, 12B2-1, 11F10-1, 17G11-1, 29D5-1, 30D8-1, 20E12-1, 26B9-1, 32G8-1, 34E7-1, 20G5-1, C6-1 y B5-1, o cualquier fragmento o parte del mismo que tenga la capacidad de unirse a EGFRvIII.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y polipéptidos de la invención, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen una función efectora alterada. Los polinucleótidos se pueden preparar y expresar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos de la invención.

Vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos se describen adicionalmente en esta memoria.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar cualquiera de los polinucleótidos descritos en esta memoria.

Polinucleótidos complementarios a cualquiera de dichas secuencias también están incluidos en la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificantes o antisentido) o de doble cadena y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Pueden estar presentes secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido de la presente invención, pero no es necesario, y un polinucleótido puede, pero no ser necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o pueden comprender una variante de una secuencia de este tipo. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, de manera que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no disminuye, con respecto a una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en esta memoria. Las variantes exhiben preferiblemente al menos aproximadamente un 70% de identidad, más preferiblemente, al menos aproximadamente un 80% de identidad, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente un 90% de identidad, y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente un 95% de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima como se describe más adelante. Comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, o de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar utilizando el programa Megalign en el conjunto de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando parámetros predeterminados. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácidos nucleicos o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes también, o alternativamente, pueden ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o una porción o complemento del mismo. Variantes de polinucleótidos de este tipo son capaces de hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN que se produce de forma natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

"Condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavar en una solución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de lavar dos veces a 65°C durante 20 minutos con SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contienen SDS al 0,1%.

Tal como se utiliza en esta memoria, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/dodecilsulfato de sodio 0.1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturante, tal como formamida, por ejemplo, 50 % (v/v) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/ 0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, solución de 5 x Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. como sea necesario para adaptarse a factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Los expertos ordinarios en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido tal como se describe en esta memoria. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en esta memoria están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse utilizando técnicas estándares (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

Los polinucleótidos de esta invención se pueden obtener utilizando síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Métodos de síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no es necesario que se describan en detalle en esta memoria. Un experto en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en esta memoria y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos utilizando métodos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado, y el vector, a su vez, se puede introducir en una célula huésped adecuada para replicación y amplificación, tal como se describe adicionalmente en esta memoria. Los polinucleótidos pueden insertarse en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado puede aislarse de la célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook et al., 1989.

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las Patentes de EE. UU. N°s 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauwer Press, Boston, 1994.

El ARN se puede obtener utilizando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN puede aislarse utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como se recoge en Sambrook et al., 1989, supra, por ejemplo.

Vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándares, o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretenda utilizar, vectores de clonación útiles tendrán generalmente la capacidad de auto-replicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador. que se pueden utilizar para seleccionar clones que contienen el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, p. ej., pUC18, pUC19, Bluescript (p. ej., pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADNs de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión son generalmente construcciones polinucleotídicas replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se da a entender que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos y vector o vectores de expresión descritos en la Publicación PCT N° WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir generalmente, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, traducción), habitualmente también se requieren uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un cierto número de medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAEextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (p. ej., en los casos en los que el vector es un agente infeccioso tal como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en esta memoria. Cualquier célula huésped capaz de sobre-expresar ADNs heterólogos puede utilizarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación PCT N° WO 87/04462. Células huésped no de mamíferos adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNs a un nivel de aproximadamente 5 veces más alto, más preferiblemente, 10 veces más alto, incluso más preferiblemente, 20 veces más alto que el del correspondiente anticuerpo o proteína endógena de interés, si está presente, en las células huésped. El rastreo de las células huésped en busca de una unión específica a EGFRvIII se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobre-expresa el anticuerpo o la proteína de interés.

Conjugados de Anticuerpos EGFRvIII

La presente invención también proporciona un conjugado (o inmunoconjugado) del anticuerpo EGFRvIII como se describe en esta memoria, en donde el anticuerpo se conjuga con un agente (p. ej., un agente citotóxico) para

inmunoterapia dirigida (p. ej., conjugados de anticuerpo-fármaco) directa o indirectamente a través de un enlazador. Por ejemplo, un agente citotóxico se puede enlazar o conjugar al anticuerpo EGFRvIII como se describe en esta memoria para el suministro local dirigido del resto del agente citotóxico a tumores (p. ej., tumor que expresa EGFRvIII).

En diversas publicaciones se han descrito métodos para conjugar agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos con anticuerpos. Por ejemplo, la modificación química se puede realizar en los anticuerpos mediante aminas de cadena lateral de lisina o mediante grupos sulfhidrilo de cisteína activados reduciendo los enlaces disulfuro entre cadenas para que se produzca la reacción de conjugación. Véase, p. ej., Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005 y Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004. También se han descrito residuos de cisteína reactivos modificados en sitios específicos de anticuerpos para la conjugación de fármacos específicos con estequiometría definida. Véase, p. ej., Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008. La conjugación utilizando una etiqueta que contiene glutamina de donante de acilo o una glutamina endógena que se vuelve reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como un donante de acilo) por modificación de polipéptidos en presencia de transglutaminasa y una amina (p. ej., un agente citotóxico que comprende o se une a una amina reactiva) también se describe en las solicitudes internacionales WO2012/059882 y WO2015015448.

En algunas realizaciones, el anticuerpo EGFRvIII o el conjugado tal como se describe en esta memoria comprende una etiqueta que contiene glutamina donante de acilo modificada en un sitio específico del anticuerpo (p. ej., un extremo carboxilo, un extremo amino o en otro sitio en el anticuerpo EGFRvIII). En algunas realizaciones, la etiqueta comprende un aminoácido glutamina (Q) o una secuencia de aminoácidos LQG, LLQGG (SEQ ID NO: 258), LLQG (SEQ ID NO: 259), LSLSQG (SEQ ID NO: 260), GGGLLQGG (SEQ ID NO: 261), GLLQG (SEQ ID NO: 262), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NO: 263), GLLQGGG (SEQ ID NO: 264), GLLQGG (SEQ ID NO: 265), GLLQ (SEQ ID NO: 266), LLQLLQGA (SEQ ID NO: 267), LLQGA (SEQ ID NO: 268), LLQYQGA (SEQ ID NO: 269), LLQGSG (SEQ ID NO: 270), LLQYQG (SEQ ID NO: 271), LLQLLQG (SEQ ID NO: 272), SLLQG (SEQ ID NO: 273), LLQLQ (SEQ ID NO: 274), LLQLLQ (SEQ ID NO: 275), LLQGR (SEQ ID NO: 276), LLQGPP (SEQ ID NO: 277), LLQGPA (SEQ ID NO: 278), GLLQGP (SEQ ID NO: 279), GLLQGA (SEQ ID NO: 280), LLQGP (SEQ ID NO: 281), LLQGP (SEQ ID NO: 282), LLQGP (SEQ ID NO: 283), LLQP (SEQ ID NO: 284), LLQPGK (SEQ ID NO: 285), LLQAPGK (SEQ ID NO: 286), LLQGP (SEQ ID NO: 287), LLQGP (SEQ ID NO: 288) y LLQLQG (SEQ ID NO: 289).

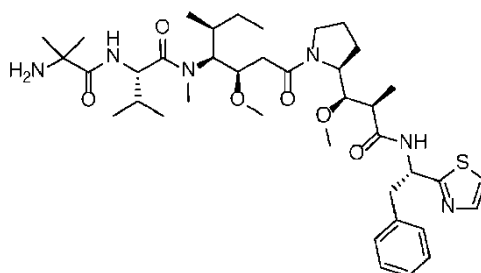
También se proporciona un anticuerpo aislado que comprende una etiqueta que contiene glutamina de un donante de acilo y una modificación de aminoácido en la posición 222, 340 o 370 del anticuerpo (esquema de numeración de la UE), en donde la modificación es una delección, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la modificación de aminoácidos es una sustitución de lisina por arginina (p. ej., K222R, K340R o K370R).

Los agentes que se pueden conjugar con los anticuerpos EGFRvIII de la presente invención incluyen, pero no se limitan a agentes citotóxicos, agentes inmunomoduladores, agentes de formación de imágenes, proteínas terapéuticas, biopolímeros u oligonucleótidos.

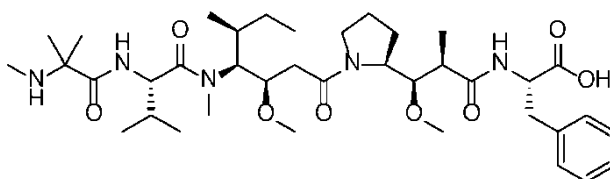
Ejemplos de un agente citotóxico incluyen, pero no se limitan a antraciclina, una auristatina, una dolastatina, una combretastatina, una duocarmicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina, un dímero de indolino-benzodiazepina, una enediina, una geldanamicina, una maitansina, una puromicina, un taxano, un alcaloide de la vinca, una camptotecina, una tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, un pladienólido y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos.

Las antraciclinas se derivan de bacterias *Streptomyces* y se han utilizado para tratar una amplia gama de cánceres, tales como leucemias, linfomas, cáncer de mama, útero, ovario y pulmón. Antraciclinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a daunorrubicina, doxorrubicina (es decir, adriamicina), epirubicina, idarrubicina, valrubicina y mitoxantrona.

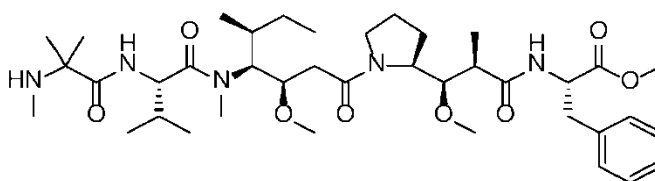
Las dolastatinas y sus análogos y derivados peptídicos, las auristatinas, son agentes antimetabólicos muy potentes que han demostrado tener actividad anticancerosa y antifúngica. Véase, p. ej., la Pat. de EE. UU. Nº 5.663.149 y Pettit et al., Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965, 1998. Ejemplos de dolastatinas y auristatinas incluyen, pero no se limitan a, dolastatina 10, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), MMAD (Monometil Auristatina D o monometil dolastatina 10), MMAF (Monometil Auristatina F o N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina), MMAE (Monometil Auristatina E o N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-norefedrina), éster AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB) y otras auristatinas novedosas (tales como las descritas en la Publicación de EE. UU. Nº 2013/0129753). En algunas realizaciones, la auristatina es 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



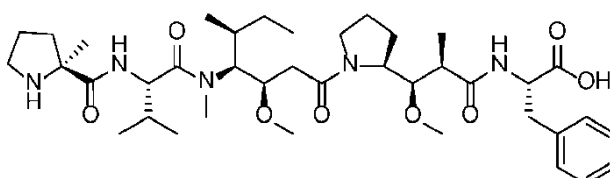
- 5 En algunas realizaciones, la auristatina es 3377 (N,2-dimetilalanil-N-((1S,2R)-4-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[[1S)-1-carboxil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil)-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



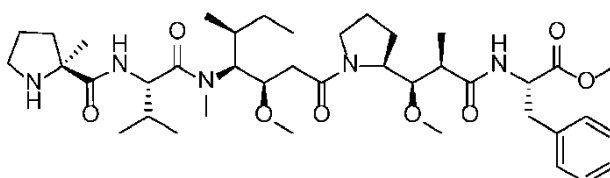
- 10 En algunas realizaciones, la auristatina es 0131-OMe (N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



- 15 En algunas realizaciones, la auristatina es 0131 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[[1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



- 20 En algunas realizaciones, la auristatina es 0121 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



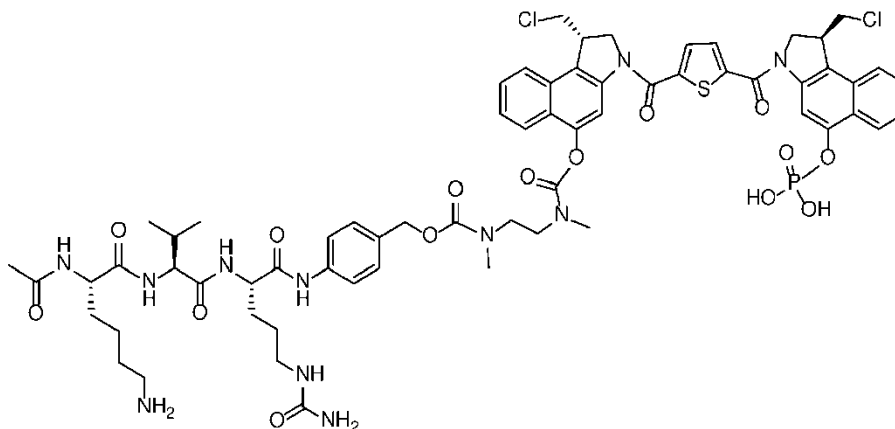
- 25 La camptotecina es un alcaloide de quinolina citotóxico que inhibe la enzima topoisomerasa I. Ejemplos de camptotecina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a topotecán e irinotecán, y sus metabolitos, tales como SN-38.

- 30 Las combretastatinas son fenoles naturales con propiedades de alteración vascular en tumores. Combretastatinas ejemplares y sus derivados incluyen, pero no se limitan a combretastatina A-4 (CA-4) y ombrabulina.

- 35 Duocarmicina y CC-1065 son agentes alquilantes de ADN con potencia citotóxica. Véase Boger y Johnson, PNAS 92:3642-3649 (1995). Ejemplos de duocarmicina y CC-1065 incluyen, pero no se limitan a (+)-duocarmicina A y (+)-

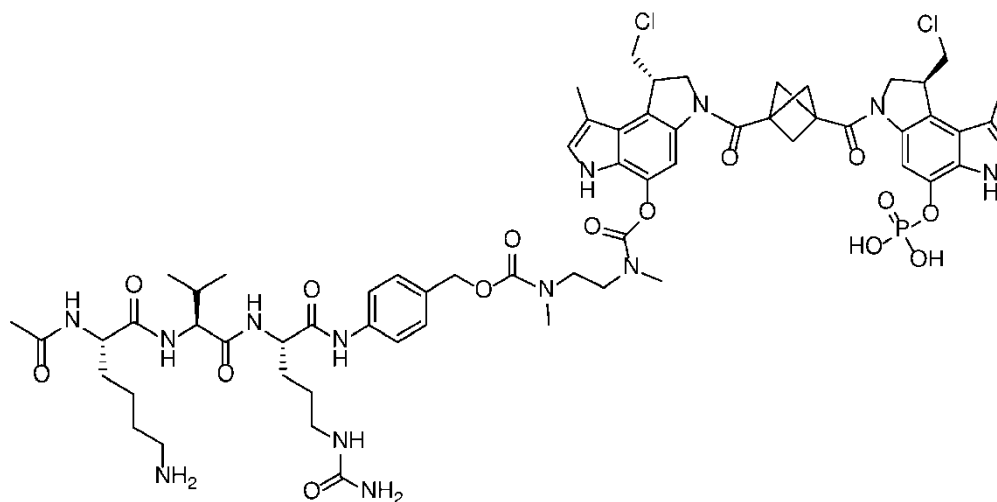
duocarmicina SA, (+)-CC-1065, y los compuestos como se describen en la solicitud internacional PCT/IB2015/050280, incluyendo, pero no limitados a N~2~-acetil-L-lisil-L-valil-L~5~-carbamoil-N-[4-(((2-(((1S)-1-(clorometil)-3-[(5-(((1S)-1-(clorometil)-5-(fosfonooxi)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-il)carbonil)tiofen-2-il)carbonil]-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-il)oxi)carbonil](metil)amino)etil)(metil)carbamoil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

5



N~2~-acetil-L-lisil-L-valil-L~5~-carbamoil-N-[4-(((2-(((8S)-8-(clorometil)-6-[(3-(((1S)-1-(clorometil)-8-metil-5-(fosfonooxi)-1,6-dihidropirrol[3,2-e]indol-3(2H)-il)carbonil]biciclo[1.1.1]pent-1-il)carbonil]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrol[3,2-e]indol-4-il)oxi)carbonil](metil)amino)etil)(metil)carbamoil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

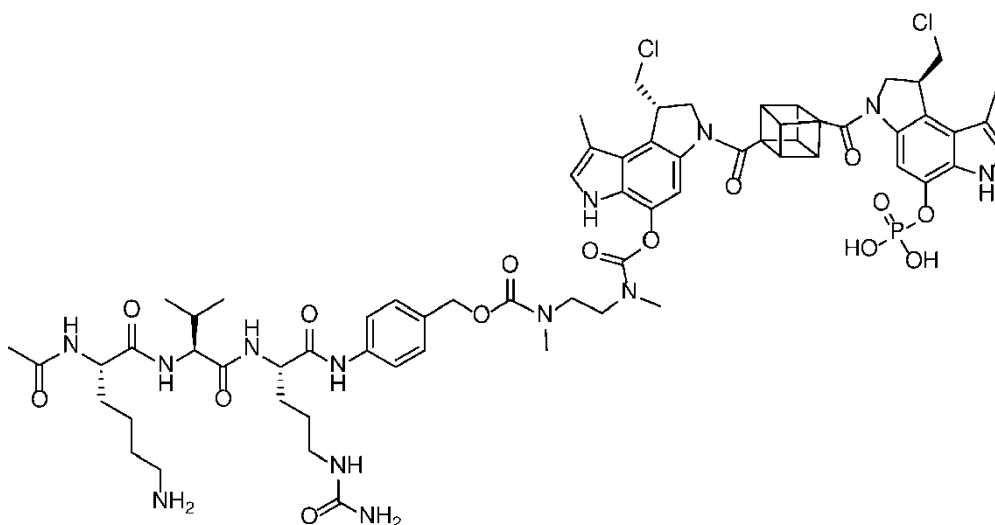
10



15

N~2~-acetil-L-lisil-L-valil-L~5~-carbamoil-N-[4-(((2-(((8S)-8-(clorometil)-6-[(4-(((1S)-1-(clorometil)-8-metil-5-(fosfonooxi)-1,6-dihidropirrol[3,2-e]indol-3(2H)-il)carbonil]pentaciclo[4.2.0.0~2,5~.0-3,8~.0~4,7~]oct-1-il)carbonyl]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrol[3,2-e]indol-4-il)oxi)carbonil](metil)amino)etil)(metil)carbamoil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

20



5 Las enediinas son una clase de productos bacterianos antitumorales caracterizados por anillos de nueve y diez miembros o por la presencia de un sistema cíclico de enlaces triples-dobles-triples conjugados. Enediinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a caliqueamicina, esperamicina, uncialamicina, dinemicina y sus derivados.

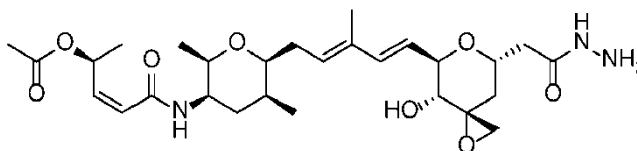
10 Las geldanamycinas son antibióticos de benzoquinona y ansamicina que se unen a Hsp90 (proteína de choque térmico 90) y se han utilizado como fármacos antitumorales. Geldanamycinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a 17-AAG (17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamycin) y 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamycin).

Hemiasterlina y sus análogos (p. ej., HTI-286) se unen a la tubulina, alteran la dinámica normal de los microtúbulos y, en cantidades estequiométricas, despolimerizan los microtúbulos.

15 Las maitansinas o sus derivados maitansinoides inhiben la proliferación celular al inhibir la formación de microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de tubulina. Véase Remillard et al., Science 189:1002-1005, 1975. Maitansinas y maitansinoides ejemplares incluyen, pero no se limitan a mertansina (DM1) y sus derivados, así como ansamitocina.

20 Los dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) y los dímeros de indolino-benzodiazepina (IGNs) son agentes antitumorales que contienen uno o más grupos funcionales imina, o sus equivalentes, que se unen al ADN dúplex. Las moléculas de PBD e IGN se basan en el producto natural atramicina e interactúan con el ADN de una manera selectiva de secuencia, con preferencia por las secuencias de purina-guanina-purina. PBDs ejemplares y sus análogos incluyen, pero no se limitan a SJG-136.

25 Las espliceostatinas y pladienolidas son compuestos antitumorales que inhiben el corte y empalme e interactúan con el espliceosoma, Sf3b. Ejemplos de espliceostatinas incluyen, pero no se limitan a, espliceostatina A, FR901464 y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il] que tiene la estructura de



35 Ejemplos de pladienólidos incluyen, pero no se limitan a Pladienólido B, Pladienólido D o E7107.

Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes anti-tubulina o inhibidores mitóticos. Taxanos ejemplares incluyen, pero no se limitan a paclitaxel (p. ej., TAXOL®) y docetaxel (TAXOTERE®).

40 Las tubulisinas son productos naturales aislados de una cepa de mixobacterias que ha demostrado despolimerizar los microtúbulos e inducir el paro mitótico. Tubulisinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a tubulisina A, tubulisina B y tubulisina D.

Los alquiloides de la vinca también son agentes anti-tubulina. Alquiloides de la vinca ejemplares incluyen, pero no se limitan a vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina.

5 Por consiguiente, en algunas realizaciones el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en MMAD (Monometil Auristatina D), 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-
 10 {{{(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]aminopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 3377 (N,2-dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-((2S)-2-[(1R,2R)-3-(((1S)-1-carboxil-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-
 15 [(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida), 0131 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-(((1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 0131-OMe (N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-
 20 [(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 0121 (2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-(((2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) y acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo.

En algunas realizaciones, el agente es un agente inmunomodulador. Ejemplos de un agente inmunomodulador incluyen, pero no se limitan a ganciclovir, etanercept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolgato mofetilo, metotrextrato, glucocorticoide y sus análogos, citoquinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, interleuquinas (p. ej., interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21), factores estimulantes de colonias (p. ej., factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)), interferones (p. ej., Interferones- α , β y γ), factor de crecimiento de células madre denominado "factor S 1", eritropoyetina y trombopoyetina, o una combinación de los mismos.

25 En algunas realizaciones, el resto de agente es un agente de formación de imágenes (p. ej., un fluoróforo o un quelante), tal como fluoresceína, rodamina, fósforos de lantánidos y sus derivados, o un radioisótopo unido a un quelante. Ejemplos de fluoróforos incluyen, pero no se limitan a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (p. ej., 5-FITC), fluoresceína amidita (FAM) (p. ej., 5-FAM), eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (p. ej., Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 o 750), carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (p. ej., 5-TAMRA), tetrametilrodamina (TMR) y sulforrodamina (SR) (p. ej., SR101). Ejemplos de quelantes incluyen, pero no se limitan a ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), 1,4,7-triazaciclononano, ácido 1-glutárico-ácido 4,7-acético (deferroxamina), ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA).

En algunas realizaciones, radioisótopos terapéuticos o de diagnóstico u otros marcadores (p. ej., marcadores PET o SPECT) se pueden incorporar en el agente para la conjugación con los anticuerpos EGFRvIII tal como se describe en esta memoria. Ejemplos de radioisótopos u otros marcadores incluyen, pero no se limitan a ^3H , ^{11}C , ^{13}N , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Se , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{103}Ru , ^{105}Rh , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{121}Te , ^{122}Te , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{125}Te , ^{126}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{133}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{153}Pb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Tm , ^{166}Dy , ^{166}H , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{169}Tm , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{197}Pt , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ac o ^{225}Ac .

45 En algunas realizaciones, el agente es una proteína terapéutica que incluye, pero no se limita a una toxina, una hormona, una enzima y un factor de crecimiento.

Ejemplos de una proteína (o polipéptido) de toxina incluyen, pero no se limitan a difteria (p. ej., cadena A de difteria), exotoxina y endotoxina de *Pseudomonas*, ricina (p. ej., cadena A de ricina), abrina (p. ej., cadena A de abrina), modicina (p. ej., cadena A de modicina), alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A *estafilocócica*, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina difteria, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, péptidos inhibidores del nudo de cistina (ICK) (p. ej., ceratotoxinas) y conotoxina (p. ej., KIIIA o SmIIa).

55 En algunas realizaciones, el agente es un polímero biocompatible. Los anticuerpos EGFRvIII tal como se describen en esta memoria se pueden conjugar con el polímero biocompatible para aumentar la semivida y la bioactividad en suero, y/o prolongar las semividas *in vivo*. Ejemplos de polímeros biocompatibles incluyen polímero hidrosoluble, tal como polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo y polímeros biocompatibles que contienen iones híbridos (p. ej., un polímero que contiene fosforilcolina).

En algunas realizaciones, el agente es un oligonucleótido, tal como oligonucleótidos antisentido.

65 En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo como se describe en esta memoria, en donde el conjugado comprende la fórmula: anticuerpo-(etiqueta que contiene glutamina de donante de acilo)-(enlazador)-(agente citotóxico).

Ejemplos de un enlazador que contiene una o más aminas reactivas incluyen, pero no se limitan a Ac-Lys-Gly (acetil-lisina-glicina), ácido aminocaproico, Ac-Lys-β-Ala (acetil-lisina-β-alanina), amino-PEG2 (polietilenglicol)-C2, amino-PEG3-C2, amino-PEG6-C2 (o amino PEG6-propionilo), Ac-Lys-Val-Cit-PABC (acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo), amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC, aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidina-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidina-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, putrescina o Ac-Lys-putrescina.

Métodos de Utilizar Anticuerpos EGFRvIII y Conjugados de Anticuerpos de los Mismos

Los anticuerpos o los conjugados de anticuerpos de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a métodos de tratamiento terapéutico y métodos de tratamiento de diagnóstico.

Los anticuerpos (p. ej., monoespecíficos y biespecíficos) y los conjugados de anticuerpos obtenidos mediante los métodos arriba descritos pueden utilizarse como un medicamento. En algunas realizaciones, un medicamento de este tipo puede utilizarse para tratar el cáncer, incluyendo tumores sólidos y tumores líquidos. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer relacionado con EGFRvIII que incluye, pero no se limita a glioblastoma (p. ej., glioblastoma multiforme), astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, carcinoma del plexo coroideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, pineocitoma, meningioma, meduloepitelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supraentorial, tumor teratoide/rabdoide atípico, glioma mixto, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, meduloblastoma, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer cervical, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de tiroides, mesotelioma, cáncer de útero, linfoma o leucemia.

Se proporciona un método de inhibir el crecimiento o la progresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan EGFRvIII, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos EGFRvIII o los conjugados de anticuerpos EGFRvIII tal como se describe en esta memoria. Se proporciona un método de inhibir la metástasis de células que expresan EGFRvIII en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende los anticuerpos EGFRvIII o los conjugados de anticuerpos EGFRvIII tal como se describe en esta memoria. Se proporciona un método de inducir la regresión del tumor en células malignas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende los anticuerpos EGFRvIII o los conjugados de anticuerpos EGFRvIII tal como se describe en esta memoria.

El anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo de acuerdo con la invención puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesite.

En algunas realizaciones, el tratamiento puede combinarse con una o más terapias contra el cáncer seleccionadas del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia con citoquinas, terapia fijada como objetivo, terapia con vacunas, terapia con células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, resección quirúrgica, terapia de luz láser y radioterapia. Por ejemplo, el anticuerpo (monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo de la invención se puede administrar a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) 1) tratamiento estándar, que incluye radiación, resección quirúrgica, quimioterapia (p. ej., temozolomida, procarbazona, carmustina, lomustina, vincristina, etc.), terapia con anticuerpos tal como bevacizumab, terapia anti-angiogénica y/o campos de tratamiento de tumores; 2) vacuna, incluyendo la vacuna EGFRvIII; 3) terapia fijada como objetivo, tal como inhibidores de quinasa (p. ej., everolimus); y 4) inmunoterapias, incluyendo, pero no limitadas a anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-41BB, anti-TIM3, anti-LAG3, anti-TIGIT, anti-OX40, anti-HVEM, anti-BTLA, anti-CD40, anti-CD47, anti-CSF1R, anti-CSF1, anti-MARCO, anti-IL8, anti-CXCR4 y anti-CTLA4.

La administración de los anticuerpos (p. ej., monoespecíficos o biespecíficos) o los conjugados de anticuerpos de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intracraneal, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de anticuerpos heteromultiméricos de la invención se administran preferiblemente mediante inyección intravenosa.

En algunas realizaciones, la administración de los anticuerpos (p. ej., monoespecíficos o biespecíficos) o los conjugados de anticuerpos puede comprender la administración de, por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros de mg por kg dentro de esos intervalos. En algunas realizaciones, la administración de los anticuerpos o los conjugados de anticuerpos puede comprender la administración de aproximadamente 0,1 a 10 mg por kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros de mg por kg dentro de esos intervalos. El anticuerpo heteromultimérico se puede administrar en una o más dosis. En algunas realizaciones, dicha cantidad eficaz del anticuerpo o del conjugado de anticuerpo se puede administrar como una dosis única. En algunas realizaciones, dicha cantidad eficaz de anticuerpos se puede

5 administrar como más de una dosis a lo largo de un período de tiempo. El momento de la administración está a criterio del médico responsable y depende del estado clínico del paciente. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de un anticuerpo dado (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o conjugado de anticuerpo para una enfermedad o afecciones particulares está dentro del conocimiento de la técnica. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. En algunas realizaciones, se administra por vía parenteral una cantidad eficaz de anticuerpo heteromultimérico o composición que comprende esos anticuerpos. En algunas realizaciones, la administración puede ser intravenosa. En algunas realizaciones, la administración se puede realizar directamente mediante inyección dentro de un tumor.

15 En algunas realizaciones, la administración de los anticuerpos anti-EGFRvIII proporcionados en esta memoria puede utilizarse con fines de diagnóstico, tal como en ensayos para identificar la proteína EGFRvIII en muestras (p. ej., en ensayos de inmunohistoquímica) o en pacientes.

15 Composiciones

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o un conjugado de anticuerpo, de la invención o una porción del mismo tal como se describe arriba en un soporte farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo las formas de iones híbridos) o como una especie cargada positiva o negativamente. En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden complejarse con un contraión para formar una "sal farmacéuticamente aceptable", que se refiere a un complejo que comprende uno o más polipéptidos y uno o más contraiones, en que los contraiones se derivan de ácidos inorgánicos y orgánicos y bases farmacéuticamente aceptables.

30 El anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo, o porciones del mismo, se puede administrar solo o en combinación con uno o más de otros polipéptidos de la invención o en combinación con uno o más de otros fármacos (o como cualquier combinación de los mismos). Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas, los métodos y los usos de la invención también abarcan realizaciones de combinaciones (co-administración) con otros agentes activos, tal como se detalla más adelante.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "co-administración", "co-administrado" y la expresión "en combinación con", que se refieren a los anticuerpos de la invención y uno o más de otros agentes terapéuticos, pretenden significar y se refieren e incluyen lo siguiente: (i) administración simultánea de una combinación de este tipo de un heterodímero descrito en esta memoria y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente; (ii) la administración sustancialmente simultánea de una combinación de este tipo de un heterodímero descrito en esta memoria y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que se toman sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, después de lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente; (iii) la administración secuencial de una combinación de este tipo de un heterodímero descrito en esta memoria y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomadas en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes se liberan en momentos sustancialmente diferentes a dicho paciente; y (iv) la administración secuencial de una combinación de este tipo de un heterodímero descrito en esta memoria y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes de una manera controlada, después de lo cual se liberan de forma simultánea, consecutiva y/o solapante en el mismo y/o en momentos diferentes a dicho paciente, en que cada una de las partes puede administrarse por la misma vía o por una diferente.

55 Generalmente, el anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo descrito en esta memoria o porciones del mismo son adecuados para ser administrado como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término 'excipiente' se utiliza en esta memoria para describir cualquier ingrediente que no sea el o los compuestos de la invención. La elección del excipiente o excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación. Tal como se utiliza en esta memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares

tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del anticuerpo.

5 Composiciones farmacéuticas de la presente invención y métodos para su preparación resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Composiciones de este tipo y métodos para su preparación se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP.

10 Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse a granel, como una sola dosis unitaria o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Tal como se utiliza en esta memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de una dosis de este tipo tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de una dosis de este tipo. Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptado en la técnica puede emplearse adecuadamente para las proteínas heterodiméricas y porciones de las mismas descritas en esta memoria.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para la administración parenteral. Tal como se utiliza en esta memoria, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, lo que generalmente resulta en la administración directa en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Por lo tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a la administración de una composición farmacéutica mediante la inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limite a inyección o infusiones subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intraesternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, intraventriculares, intrauretrales, intracraneales, intrasinoaviales; y técnicas de infusión de diálisis renal. Realizaciones preferidas incluyen las vías intravenosa y subcutánea.

20 Formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para la administración parenteral típicamente comprenden generalmente el ingrediente activo combinado con un soporte farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Formulaciones de este tipo pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y similares. Formulaciones de este tipo pueden comprender, además, uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granular) para reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril apirógena) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, hidratos de carbono y agentes tampón (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca a utilizar junto con un vehículo adecuado, tal como agua estéril apirógena. Formas de administración parenteral ejemplares incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Formas de dosificación de este tipo se pueden tamponar adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen las que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina o en una preparación liposomal. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen formulaciones de liberación controlada, retardada, sostenida, pulsada, dirigida y programada. Por ejemplo, en un aspecto, se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando la proteína heterodimérica, p. ej., anticuerpo biespecífico, en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes arriba enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión de carácter básico y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

65 Una composición farmacéutica ejemplar, no limitante de la invención es una formulación en forma de una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de

aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de un anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o un conjugado de anticuerpo descrito en esta memoria, desde aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón de histidina, desde aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL de polisorbato 80, desde aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trehalosa, y desde aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente de acuerdo con lo que indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los pacientes/sujetos a tratar; cada una de las unidades contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está generalmente dictaminada y depende directamente de (a) las características únicas del agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de mezclado de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Por lo tanto, el experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en esta memoria, que la dosis y el régimen de dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, se puede establecer fácilmente la dosis máxima tolerable y también se puede determinar la cantidad eficaz que proporciona un beneficio terapéutico detectable a un paciente, así como los requisitos temporales para administrar cada uno de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico detectable al paciente. Por consiguiente, aunque en esta memoria se ejemplifican determinados regímenes de dosis y administración, estos ejemplos no limitan de modo alguno la dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente en la práctica de la presente invención.

Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación recogidos en esta memoria son ejemplares únicamente y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención puede basarse en una diversidad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración y el anticuerpo particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar de forma rutinaria utilizando métodos estándares. Por ejemplo, las dosis se pueden ajustar basándose en parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente invención abarca la escalada de dosis intra-pacientes de acuerdo con lo que determine el experto en la materia. La determinación de las dosis y regímenes apropiados es bien conocida en la técnica relevante y el experto en la materia entenderá que está comprendida una vez que se proporcionen las enseñanzas descritas en esta memoria.

Para la administración a sujetos humanos, la dosis mensual total de un anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o un conjugado de anticuerpo descrito en esta memoria está típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1200 mg por paciente, dependiendo, por supuesto, del modo de administración, del mecanismo de acción y de la biología diana. Por ejemplo, una dosis mensual intravenosa puede requerir aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg/paciente. La dosis mensual total puede administrarse en dosis únicas o divididas y, a criterio del médico, puede quedar fuera del intervalo típico que se proporciona en esta memoria.

Un intervalo ejemplar, no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o un conjugado de anticuerpo, descrito en esta memoria es de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg/paciente/mes. En determinadas realizaciones, la proteína heterodimérica se puede administrar a aproximadamente 1 a aproximadamente 200 o aproximadamente 1 a aproximadamente 150 mg/paciente/mes.

Kits

La invención también proporciona kits para uso en los presentes métodos. Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden el anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo de la invención e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. Generalmente, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración de la proteína heterodimérica para los tratamientos terapéuticos arriba descritos.

Las instrucciones relacionadas con el uso del anticuerpo (p. ej., monoespecífico o biespecífico) o el conjugado de anticuerpo tal como se describe en esta memoria incluyen generalmente información sobre la dosis, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (p. ej., envases multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles mecánicamente (p. ej., instrucciones en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de esta invención están en envases adecuados. Envases adecuados incluyen, pero no se limitan a viales, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., Mylar o bolsas de plástico selladas) y similares. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (p. ej., un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Un kit puede tener también un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo biespecífico. El recipiente puede comprender, además, un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto(s) en el recipiente o asociados con el recipiente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en esta memoria resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior.

Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1: Determinación de Afinidad para Anticuerpos Quiméricos Murinos-Humanos Anti-EGFRvIII Recombinantes y Anticuerpos Humanizados

Este ejemplo determina la afinidad de los anticuerpos anti-EGFRvIII quiméricos y humanizados a 25°C y 37°C.

El anticuerpo anti-EGFRvIII de ratón (m), m62G7, generado a partir de hibridomas, se secuenció y subclonó en vectores adecuados para la expresión como anticuerpos quiméricos murinos-humanos. Las CDRs del anticuerpo de ratón m62G7 se injertaron en un marco humano y se expresaron como anticuerpo recombinante IgG1 humano, h62G7. Se prepararon variantes de afinidad de h62G7 mediante la introducción de mutaciones en las CDRs de las cadenas pesada y ligera. Las afinidades del anticuerpo quimérico anti-EGFRvIII recombinante m62G7 y los anticuerpos h62G7 humanizados se midieron en un biosensor de resonancia de plasmón de superficie Biacore™ T200 equipado con un chip sensor CM4 acoplado con Fc anti-humano de calidad de investigación (GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ). A continuación, los anticuerpos anti-EGFRvIII fueron capturados por Fc anti-humano. A continuación, se inyectó el dominio extracelular EGFRvIII humano monomérico marcado con 8-histidina como el analito en una serie de diluciones de 10 veces con una concentración superior a 1000 nM. Se midió la afinidad de los anticuerpos anti-EGFRvIII por el EGFRvIII humano tanto a 25°C como a 37°C (Tabla 6). Ninguno de estos anticuerpos mostró unión detectable a la proteína EGFRwt recombinante de tipo salvaje marcada con 8-histidina 1000 nM en las mismas condiciones de ensayo.

En la Tabla 6, las variantes de h62G7 se describen con referencia a la variación de la cadena pesada y luego a la variación de la cadena ligera. Por ejemplo, el clon de anticuerpo "h62G7-EQ/L6" se refiere al clon h62G7 que contiene la variación "EQ" en la cadena pesada (a la que también se alude en esta memoria como "h62G7-EQ") y la variación "L6" en la cadena ligera (a la que también se alude en esta memoria como "h62G7-L6"). Estas secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera se proporcionan en la Tabla 2. Además, en la presente solicitud, se puede hacer referencia a una variante de h62G7 con la variante de cadena pesada o de cadena ligera escrita primero - así, por ejemplo, "h62G7-EQ/L6" y "h62G7-L6/EQ" se refieren a un anticuerpo que contiene una cadena pesada de h62G7-EQ y una cadena ligera de h62G7-L6.

Tabla 6

| Anticuerpo | 25°C | | | 37°C | | |
|----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (nM) | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (nM) |
| m62G7 | 7,30E+05 | 6,40E-02 | 88,7 | 8,00E+05 | 1,70E-01 | 207,0 |
| h62G7-EQ/L6 | 2,40E+05 | 1,00E-02 | 43,8 | 6,60E+05 | 7,40E-02 | 112,8 |
| h62G7-EQ/L1-DV | 2,00E+05 | 1,20E-05 | 59,9 | 3,70E+05 | 6,90E-02 | 185,8 |

| Anticuerpo | 25°C | | | 37°C | | |
|-----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (nM) | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (nM) |
| h62G7-H14/L1-DV | 1,80E+04 | 2,00E-02 | 1087,9 | 6,60E+04 | 1,00E-01 | 1539,6 |
| h62G7-H14/L6 | 1,30E+04 | 1,30E-02 | 992,2 | 4,30E+04 | 6,80E-02 | 1583,3 |

Ejemplo 2: Determinación de la Afinidad por Anticuerpos Humanos Anti-EGFRvIII

5

Este ejemplo determina la afinidad de diversos anticuerpos humanos anti-EGFRvIII a 37°C.

10

Para generar anticuerpos humanos contra EGFRvIII, se inmunizaron ratones transgénicos AlivaMab (Ablexis LLC, San Francisco, CA) con un esquema alterno de la línea celular de glioblastoma de rata que expresa EGFRvIII, F98-npEGFRvIII (American Type Culture Collection, Manassas, VA) y péptidos (SEQ ID NO: 227: CGSGSGLEEKKGNYVVDH) dirigido a la región de unión en EGFRvIII. Los hibridomas se generaron utilizando técnicas estándares. Para determinar la afinidad y especificidad de unión de estos hibridomas a EGFRvIII, se capturaron anticuerpos en sobrenadantes de cultivo mediante Fc anti-ratón utilizando un biosensor de Biacore™ T200 equipado con chips sensores CM4 acoplados con Fc anti-ratón (Biacore™ AB, Uppsala, Suecia - ahora GE Healthcare). A continuación, se inyectó el dominio extracelular EGFRvIII humano monomérico marcado con 8-histidina como el analito en una serie de diluciones de 10 veces partiendo con una concentración superior a 1000 nM. Se midió la afinidad de los anticuerpos anti-EGFRvIII por el EGFRvIII humano a 37°C (Tabla 7). Ninguno de estos anticuerpos de hibridoma mostró unión detectable a la proteína EGFRwt recombinante de tipo salvaje marcada con 8-histidina 1000 nM en las mismas condiciones de ensayo.

15

20

Tabla 7

| Anticuerpo | Unión de EGFRvIII a 37°C | | |
|------------|--------------------------|----------------------|---------------------|
| | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (nM) |
| 42G9 | 6,88E+04 | 5,63E-04 | 8,2 |
| 32A10 | 6,54E+04 | 6,26E-04 | 9,6 |
| 21E11 | 6,66E+04 | 6,32E-04 | 9,5 |
| 49B11 | 7,64E+04 | 6,95E-04 | 9,1 |
| 46E10 | 5,97E+04 | 7,16E-04 | 12,0 |
| 12H6 | 5,93E+04 | 7,33E-04 | 12,4 |
| 19A9 | 5,58E+04 | 1,04E-03 | 18,6 |
| 11B11 | 5,21 E+04 | 1,13E-03 | 21,7 |
| 21E7 | 6,52E+04 | 1,30E-03 | 19,9 |
| 20B9 | 4,67E+04 | 1,50E-03 | 32,1 |
| 12B2 | 7,38E+04 | 1,79E-03 | 24,3 |
| 11F10 | 6,63E+04 | 2,81 E-03 | 42,4 |
| 17G11 | 5,61E+04 | 3,00E-03 | 53,5 |
| 29D5 | 1,02E+05 | 4,24E-03 | 41,6 |
| 14C11 | 7,55E+04 | 5,93E-03 | 78,5 |
| 20E12 | 3,99E+04 | 1,41E-02 | 353,4 |
| 20G5 | 1,25E+05 | 2,89E-02 | 231,2 |
| 26B9 | 1,31E+05 | 3,20E-02 | 244,3 |
| 30D8 | 1,61E+05 | 2,77E-02 | 172,0 |
| 32G8 | 6,82E+03 | 1,22E-02 | 1788,9 |
| 34E7 | 3,77E+04 | 1,28E-02 | 339,5 |

Ejemplo 3: Especificidad de Unión de Anticuerpos Anti-EGFRvIII a Líneas Celulares que expresan EGFRvIII mediante Citometría de Flujo

5 Este ejemplo demuestra la especificidad de unión celular de los anticuerpos anti-EGFRvIII a células que expresan EGFRvIII.

10 Para evaluar la especificidad de unión celular de los anticuerpos anti-EGFRvIII generados a partir de ratones AlivaMab, se utilizaron tres líneas celulares de glioblastoma de rata isogénicas y una línea celular de cáncer humano: F98 (no expresa forma alguna de EGFR humano), F98-EGFRwt (expresa EGFR de tipo salvaje), F98- η EGFRvIII (expresa EGFRvIII) y A431 (una línea celular de carcinoma epidermoide con sobre-expresión de EGFR de tipo salvaje), todas obtenidas de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Para la tinción celular, se incubaron 15 500.000 células con 50 μ l de sobrenadantes de hibridoma durante 45 min a 4°C, se lavaron con tampón de unión (PBS (solución salina tamponada con fosfato) + BSA (albúmina de suero bovino) al 0,5%, seguido de incubación con anticuerpo secundario específico para Fc anti-ratón de cabra conjugado con FITC de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Las Tablas 8A y 8B muestran que las intensidades fluorescentes medias (MFI) de anticuerpos EGFRvIII (excepto el clon 20G5) en la línea celular que expresa EGFRvIII fueron al menos 10 veces mayores que en las líneas celulares que no expresan. Las FIG. 1A, FIG. 1B y FIG. 1C muestran ejemplos de 20 histogramas de unión a FACS de tres clones específicos para EGFRvIII que habían sido clonados y expresados como anticuerpos IgG1 humanos recombinantes, 42G9 (FIG. 1A), 32A10 (FIG. 1B) y 32G8 (FIG. 1C), a las tres líneas celulares F98.

Tabla 8A

| Anticuerpo | F98 | | F98-EGFRwt | | F98-EGFRvIII | | A431 | |
|----------------------|-----|------------|------------|------------|--------------|------------|-------|------------|
| | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo |
| 2.º Ab solo | 170 | 0,6 | 202 | 1,7 | 258 | 2,3 | 592 | 0,4 |
| anti-EGFR(wt y vIII) | 163 | 0,5 | 9608 | 98,3 | 5329 | 99,4 | 55240 | 100,0 |
| 42G9 | 159 | 0,4 | 185 | 1,6 | 3247 | 98,5 | 538 | 0,3 |
| 32A10 | 159 | 0,5 | 185 | 1,4 | 3349 | 98,3 | 531 | 0,2 |
| 21E11 | 159 | 0,3 | 184 | 1,3 | 3105 | 98,5 | 555 | 0,5 |
| 49B11 | 156 | 0,6 | 185 | 1,3 | 2980 | 98,5 | 599 | 0,8 |
| 46E10 | 158 | 0,4 | 187 | 1,6 | 2986 | 98,7 | 560 | 0,5 |
| 12H6 | 157 | 0,5 | 188 | 1,9 | 3445 | 98,3 | 569 | 0,8 |
| 19A9 | 158 | 0,5 | 168 | 1,6 | 3100 | 98,1 | 578 | 1,0 |
| 11B11 | 161 | 0,6 | 187 | 1,7 | 3391 | 98,2 | 589 | 1,2 |
| 21E7 | 159 | 0,3 | 184 | 1,3 | 3105 | 98,5 | 603 | 1,1 |
| 20B9 | 157 | 0,3 | 189 | 1,8 | 3418 | 98,3 | 558 | 0,7 |
| 12B2 | 156 | 0,4 | 185 | 1,5 | 2749 | 97,9 | 571 | 0,8 |
| 11F10 | 155 | 0,5 | 187 | 1,6 | 3283 | 98,0 | 582 | 1,1 |
| 17G11 | 157 | 0,6 | 184 | 1,5 | 3357 | 98,1 | 556 | 0,7 |
| 29D5 | 155 | 0,3 | 185 | 1,3 | 2829 | 97,9 | 531 | 0,4 |
| 14C11 | 157 | 0,4 | 185 | 1,3 | 3213 | 98,2 | 580 | 0,8 |

Tabla 8B

| Anticuerpo | F98 | | F98-EGFRwt | | F98-EGFRvIII | | A431 | |
|----------------------|-----|------------|------------|------------|--------------|------------|-------|------------|
| | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo |
| 2º Ab solo | 235 | 0,2 | 252 | 0,2 | 322 | 1,3 | 185 | 0,7 |
| anti-EGFR(wt y vIII) | 245 | 0,3 | 6857 | 97,2 | 5827 | 99,4 | 44493 | 100,0 |

| Anticuerpo | F98 | | F98-EGFRwt | | F98-EGFRvIII | | A431 | |
|------------|------|------------|------------|------------|--------------|------------|------|------------|
| | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo | MFI | % positivo |
| 20E12 | 381 | 6,0 | 348 | 3,4 | 3976 | 97,9 | 302 | 2,6 |
| 20G5 | 1248 | 16,8 | 1070 | 12,6 | 4639 | 98,5 | 391 | 2,0 |
| 26B9 | 310 | 4,1 | 298 | 2,3 | 5405 | 98,6 | 276 | 1,7 |
| 30D8 | 296 | 4,0 | 280 | 1,7 | 5165 | 98,6 | 269 | 1,3 |
| 32G8 | 329 | 4,9 | 301 | 1,6 | 3734 | 98,6 | 271 | 1,2 |
| 34E7 | 485 | 6,9 | 371 | 4,0 | 4128 | 98,5 | 294 | 1,1 |

Ejemplo de Referencia 4: Determinación de la Afinidad para Anticuerpos Anti-EGFRvIII Completamente Humanos de la fagoteca

5

Este ejemplo determina la afinidad de diversos anticuerpos humanos anti-EGFRvIII a 25°C.

10

Anticuerpos humanos anti-EGFRvIII obtenidos del rastreo de la fagoteca se secuenciaron y subclonaron en vectores adecuados para la expresión como anticuerpos IgG1 humanos recombinantes. Las afinidades de los anticuerpos se midieron a 25°C (Tabla 9) en un biosensor de resonancia de plasmón de superficie Biacore™ T200 equipado con un chip sensor CM4 acoplado con Fc anti-humano (GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ). Los anticuerpos anti-EGFRvIII fueron capturados por Fc anti-humano. A continuación, se inyectó el dominio extracelular EGFRvIII humano monomérico marcado con 8-histidina como el analito en una serie de diluciones de 10 veces partiendo a 1000 nM. Entre los dos anticuerpos, solo C6 mostró una unión muy débil pero detectable a la proteína EGFRwt recombinante de tipo salvaje etiquetada con 8-histidina 1000 nM a 25°C.

15

Tabla 9

| Anticuerpo | Unión de EGFRvIII a 25°C | | |
|------------|--------------------------|------------|-----------|
| | $k_a(1/MS)$ | $k_d(1/s)$ | $K_D(nM)$ |
| B5 | 2,08E+04 | 1,41E-02 | 677,9 |
| C6 | 1,68E+04 | 8,94E-03 | 532,1 |

20

Ejemplo 5: Generación y Caracterización de Líneas Celulares GBM Expresión de EGFRvIII

Este ejemplo demuestra la expresión de EGFR y EGFRvIII de tipo salvaje en líneas celulares GBM.

25

30

35

40

Se utilizaron cinco líneas celulares de glioblastoma humano transducidas con GFP (proteína verde fluorescente) y luciferasa, DKMG, LN18, LN18-EGFRvIII, LN229 y LN229-EGFRvIII para la caracterización funcional. DKMG, que expresa tanto EGFR endógeno de tipo salvaje como EGFRvIII, se obtuvo de DSMZ (Braunschweig, Alemania). LN18 y LN229, que expresan solo EGFR de tipo salvaje, se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Para generar líneas celulares marcadas con GFP-luciferasa, se transdujeron DKMG, LN18 y LN229 con partículas de lentivirus (Amsbio, Cambridge, MA) que codifican tanto GFP (proteína verde fluorescente) como luciferasa en un sistema bicistrónico. A continuación, se generaron LN18-EGFRvIII y LN229-EGFRvIII por transducción de las líneas celulares parentales, con un vector lentivirus que codifica el gen EGFRvIII de longitud completa (SEQ ID NO: 201). A continuación, se analizó la expresión de EGFR y EGFRvIII de tipo salvaje en cada una de las líneas celulares utilizando un citómetro de flujo. Para la tinción celular, se incubaron 300.000 células con 3 µg anticuerpo de tipo salvaje específico para EGFR o específico para EGFRvIII en 100 µl de tampón de unión (PBS (solución salina tamponada con fosfato) + FBS al 2%) durante 45 min a 4°C, se lavaron con tampón de unión, seguido de incubación con anticuerpo secundario específico de cabra anti-Fc humano conjugado con Alexa Fluor 647 de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Las FIGs. 2A-C muestran los perfiles de expresión de EGFR y EGFRvIII de tipo salvaje en LN229-EGFRvIII, LN18-EGFRvIII y DKMG, respectivamente.

Ejemplo 6: Ensayos de citotoxicidad in vitro con anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3

Este ejemplo demuestra la citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 para líneas celulares GBM que expresan EGFRvIII.

45

Para generar anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3, los dominios variables de cadena pesada de anticuerpos anti-EGFRvIII y anti-CD3 se subclonaron en los vectores biespecíficos basados en IgG2 humana apropiados y se expresaron con su correspondiente cadena ligera en células HEK293. La purificación de los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 se realizó de acuerdo con métodos publicados (J Mol Biol, 2012, 3, pp 204-219; publicación de patente de EE. UU. 2013/0115208). En estos ensayos, los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 contienen la secuencia anti-EGFRvIII de clones anti-EGFRvIII h62G7-EQ/L6, 30D8 o 42G9.

Las células diana en este Ejemplo fueron: células LN18-EGFRvIII transducidas con EGFRvIII (FIG. 3A) y células LN18 parentales (FIG. 3B); células LN229-EGFRvIII transducidas con EGFRvIII (FIG. 4A) y células LN229 parentales (FIG. 4B); y células DKMG (que expresan proteínas endógenas EGFRvIII y EGFR de tipo salvaje) (FIG. 5).

Para los ensayos de citotoxicidad, las células diana transducidas con luciferasa se sembraron en placas blancas de 96 pocillos a razón de 10.000 células/pocillo en medio PBMC (RPMI, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen/Strep al 1%, β -mercaptoetanol 20 μ M, HEPES 10 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM) y se incubaron a 37°C. Veinticuatro horas después, se añadieron células T activadas en la proporción T:E (diana:efector) deseada (10,000 células T para 1:1, para células LN18 y LN229; 50,000 células T para 1:5, para células DKMG) a células diana junto con los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3, IgG humana de control negativo, anticuerpo monovalente CD3 de control negativo en la cadena principal Fc biespecífica o mAb 42G9 anti-EGFRvIII bivalente de control negativo en IgG humana de tipo salvaje. Las células se incubaron durante otras 24 h a 37°C. Para detectar la cantidad de células diana viables al final del ensayo, se descartó el medio y se añadieron 100 μ l de luciferina a razón de 150 μ g/ml a cada uno de los pocillos. La señal de luminiscencia se adquirió en el Lector de Placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El porcentaje de células diana vivas se determinó normalizando la lectura de luminiscencia para cada una de las muestras a la del pocillo de control que contenía solo células diana.

Los resultados se resumen en las FIGs. 3A, 3B, 4A, 4B y 5. En los gráficos, los datos del anticuerpo biespecífico EGFRvIII-CD3 están representados por símbolos vacíos y los datos del anticuerpo de control negativo están representados por símbolos rellenos.

Las células diana que expresaron EGFRvIII mostraron una respuesta dependiente de la dosis al tratamiento con anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 h62G7-EQ/L6/CD3 biFc, 30D8/CD3 biFc y 42G9/CD3 biFc. Por el contrario, las células diana que expresaban la proteína EGFR de tipo salvaje solamente no se exterminaron, lo que indica la especificidad de los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 para las células que expresan EGFRvIII. Además, las células diana que expresaban EGFRvIII no mostraron una respuesta al tratamiento con anticuerpos de control negativo IgG humana, CD3 biFc monovalente o 42G1 hlgG1 (anticuerpo anti-EGFRvIII).

Por ejemplo, las células diana LN18-EGFRvIII tratadas con h62G7-EQ/L6/CD3 biFc 0,01 nM eran viables solo en aproximadamente un 20% al final del ensayo. Por el contrario, las células diana LN18-EGFRvIII tratadas con IgG de control 0,1 nM, CD3 mono biFc o 42G9 hlgG1 eran viables en aproximadamente un 100% al final del ensayo (FIG. 3A). Además, las células diana de la línea celular parental LN18 tratadas con h62G7-EQ/L6/CD3 biFc 0,01 nM eran viables en aproximadamente un 100% al final del ensayo (FIG. 3B).

En otro ejemplo, las células diana LN229-EGFRvIII tratadas con 42G9/CD3 biFc 0,01 nM eran solo aproximadamente un 35% viables al final del ensayo. Por el contrario, las células diana LN229-EGFRvIII tratadas con IgG de control 0,1 nM, CD3 mono biFc o 42G9 hlgG1 eran viables en aproximadamente un 90-100% al final del ensayo (FIG. 4A). Además, las células diana de la línea celular parental LN229 tratadas con 42G9/CD3 biFc 0,01 nM eran viables en aproximadamente un 100% al final del ensayo (FIG. 4B).

En otro ejemplo, las células diana DKMG tratadas con h62G7-EQ/L6/CD3 biFc 1 nM eran viables solo en aproximadamente un 35% al final del ensayo (FIG. 5). Por el contrario, las células diana DKMG tratadas con IgG de control 1 nM, CD3 mono biFc o 42G9 hlgG1 eran viables en aproximadamente un 100% al final del ensayo (FIG. 5).

Estos datos demuestran que los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 median eficazmente en el exterminio por células T de células que expresan EGFRvIII.

Ejemplo 7: Estudio In Vivo de Anticuerpos Biespecíficos Anti-EGFRvIII-CD3 en un modelo de GBM LN229-EGFRvIII

Este ejemplo determina la actividad antitumoral *in vivo* de anticuerpos biespecíficos anti-EGFRvIII en un modelo subcutáneo de la línea celular LN229-EGFRvIII de GBM.

Se implantaron subcutáneamente tres millones de células LN229-EGFRvIII en ratones NSG de 5-6 semanas de edad (Jackson Laboratory, Sacramento, CA). El volumen del tumor se midió una vez a la semana mediante un dispositivo de calibrado y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen del tumor = (longitud \times anchura²) / 2. El día 18 después de la implantación del tumor, los animales se asignaron al azar por tamaños de tumor en cinco animales

por grupo. Se administró una dosis única de 20 millones de células T pan frescas por vía intraperitoneal, seguida de una inyección en bolo en la vena de la cola de 0,5 mg/kg de anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 (los anticuerpos contenían la secuencia anti-EGFRvIII de los clones anti-EGFRvIII h62G7-EQ/L6, 30D8 o 42G9), o control monovalente CD3 en la cadena principal de Fc biespecífico.

5 Los resultados se resumen en la FIG. 6. En el gráfico, los datos del anticuerpo biespecífico EGFRvIII-CD3 están representados por símbolos vacíos y los datos del anticuerpo de control negativo están representados por símbolos rellenos.

10 Los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 h62G7-EQ/L6/CD3 biFc, 30D8/CD3 biFc y 42G9/CD3 biFc inhibieron el crecimiento *in vivo* de las células GBM LN229-EGFRvIII que expresan EGFRvIII. Por el contrario, el anticuerpo de control negativo CD3 monovalente biFc y un control sin tratamiento (es decir, al ratón no se le administraron células T ni anticuerpo) no inhibieron el crecimiento *in vivo* de las células GBM LN229-EGFRvIII. Por ejemplo, el día 37
 15 después de la implantación del tumor, el volumen medio del tumor para los ratones tratados con los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 30D8/CD3 biFc y 42G9/CD3 biFc fue inferior a 100 mm³, mientras que el volumen medio del tumor para los ratones sin tratamiento o tratados con el biFc monovalente CD3 fue superior a 1200 mm³.

Estos datos demuestran las actividades antitumorales *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos EGFRvIII-CD3 contra las células tumorales que expresan EGFRvIII.

20 LISTA DE SECUENCIAS

<110> PFIZER INC.
 Wong, Oi Kwan
 25 Chou, Joyce Ching

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA VARIANTE III DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SUS USOS

30 <130> PC72271Prov2

<160> 292

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción Sintética

45 <400> 1

ES 2 904 593 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Thr Leu His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Glu Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

- <210> 2
- <211> 112
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción Sintética
- <400> 2

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Phe Tyr Tyr Cys Val Gln Asp
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

- 15 <210> 3

ES 2 904 593 T3

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Glu Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

15 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 4

ES 2 904 593 T3

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

<210> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Trp Pro Ile Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Glu Ala Gln Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

5

<400> 6

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Asp
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

20

<400> 7

ES 2 904 593 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Trp Pro Ile Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Glu Ala Glu Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

5

<400> 9

```

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Leu Lys Pro Thr Glu
 1                               10                               15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
                20                               25                               30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Lys Leu Ser
 50                               55                               60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65                               70                               75                               80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Ala Pro Val Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
                85                               90                               95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
                100                               105                               110

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

10

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 10

ES 2 904 593 T3

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

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 11

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

5 <400> 12

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Thr Arg Ala Thr Gly Leu Pro Gly Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Asn Ile Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Ser Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 13

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción Sintética

<400> 13

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

Leu Arg Gly Arg Ile Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Gly Leu Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Leu Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

Pro Gly Phe Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 14

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Phe Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Ile Tyr Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

5

<400> 15

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Thr | Leu | Lys | Glu | Ser | Gly | Pro | Val | Leu | Val | Lys | Pro | Thr | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Asn | Asn | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Arg | Met | Gly | Val | Ser | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Ala | Leu | Glu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Trp | Phe | Ala | His | Ile | Phe | Ser | Thr | Asp | Glu | Lys | Ser | Phe | Arg | Thr | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Arg | Ser | Arg | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Asp | Thr | Ser | Lys | Ser | Gln | Val |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Val | Leu | Thr | Met | Thr | Asn | Met | Asp | Pro | Val | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Tyr |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Cys | Ala | Arg | Asp | Ser | Ser | Asn | Tyr | Glu | Gly | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Gln | Gly | Ile | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | | | |

10

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 16

20

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | Ser | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

ES 2 904 593 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 17
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 17

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

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

15 <210> 18
 <211> 107
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

ES 2 904 593 T3

<400> 18

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

5

<210> 19
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción Sintética

15

<400> 19

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 904 593 T3

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 20

10

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp
          20              25              30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35              40              45

Ser Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly
          50              55              60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Phe
          85              90              95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100              105
    
```

<210> 21
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 21

20

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Ile Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 22

Glu Val Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Asn Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Asn
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Leu
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Asn Ile Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Ser Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

5 <400> 23

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

10 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción Sintética

<400> 24

ES 2 904 593 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Leu
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Asn Ile Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Ser Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 25

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Arg Leu Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

5 <400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Arg Asn
20 25 30

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

Phe Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu His Ser Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 27

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción Sintética

<400> 27

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
20 25 30

20

ES 2 904 593 T3

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 28
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción Sintética
- 10 <400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Asn
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu
 35 40 45

Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Asn Ile Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- 15 <210> 29
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción Sintética
- 20 <400> 29

ES 2 904 593 T3

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

<210> 30
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 30

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Val Arg Asp Ser Ser Asn Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

5 <400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Tyr Asn Asn Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 32

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción Sintética

<400> 32

ES 2 904 593 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Ile Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Cys Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
 20 25 30

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

Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Phe
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 33

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

Glu Arg Thr Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Glu Tyr Asn Asn Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

5

<400> 34

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Ile Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Cys Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Phe
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 35

20

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

5 <400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Val Val
 50 55 60
 Pro Leu Asn Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Val Pro Gly Ser Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción Sintética

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn

20

ES 2 904 593 T3

<400> 40

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

5

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción Sintética

15

<400> 41

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

ES 2 904 593 T3

50 55 60

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asp Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Pro Gly Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Construcción Sintética

10

<400> 42

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
20 25 30

Asp Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Construcción Sintética

20

<400> 43

ES 2 904 593 T3

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Ile Thr Asp Gly Gly Val Ile Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Arg Asn Arg Cys Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Glu Met His Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Ile Pro Gly Asn Asp Asp Phe Asp Met Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Arg Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 44

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

ES 2 904 593 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Ala Pro Gly Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 47

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

<210> 48

ES 2 904 593 T3

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción Sintética
 <400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Thr Tyr His Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Gly Ala
 100 105 110
 Met Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10

<210> 49
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción Sintética

20 <400> 49

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

ES 2 904 593 T3

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

<210> 50
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 50

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

15 115

120

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

ES 2 904 593 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 51

5

```

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
    
```

<210> 52

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

15

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (100)..(101)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

20

<400> 52

```

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
          20           25           30
    
```

ES 2 904 593 T3

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Lys Leu Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Ala Pro Val Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 53
- <211> 121
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (100)..(101)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 53

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 54
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción Sintética
 <220>
 10 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
 <400> 54
 15
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60
 Leu Arg Gly Arg Ile Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Leu Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Pro Gly Phe Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 55
 <211> 121
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción Sintética
 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
 30 <400> 55

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Phe Arg Thr Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56
 <211> 122
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

15 <400> 56

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

ES 2 904 593 T3

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

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

<210> 57
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 57

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

ES 2 904 593 T3

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 58
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (100)..(101)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

15 <400> 58

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Ile Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20 <210> 59
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Construcción Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
30 <222> (100)..(101)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

ES 2 904 593 T3

<400> 59

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 60
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción Sintética

15

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

20

<400> 60

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Arg Leu Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 61
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 61

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser
 50 55 60

ES 2 904 593 T3

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Met Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 62

Thr Asp Tyr Thr Leu His
1 5

15 <210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
1 5

30 <210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 64

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Leu His
1 5 10

40 <210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 65

ES 2 904 593 T3

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

Gly

5 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción Sintética
 10 <400> 66

Gly Ile Asp Pro Ile Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10

15 <210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Construcción Sintética
 <400> 67

Gly Glu Ala Met Asp Ser
 1 5

25 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción Sintética
 35 <400> 68

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

Gly

40 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Construcción Sintética
 <400> 69

Gly Ile Asn Pro Ile Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10

50 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 70

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

5 Gly

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

15 <400> 71

Gly Ile Trp Pro Ile Thr Gly Gly Thr Thr Tyr
1 5 10

<210> 72

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción Sintética

<400> 72

Gly Ile Trp Pro Ile Thr Gly Gly Thr Thr Tyr
1 5 10

30 <210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Construcción Sintética

<400> 73

40 <210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

45 <210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Construcción Sintética

<400> 74

Ser Asn Pro Arg Met Gly Val Ser
1 5

55 <210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

5 <400> 75

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro Arg
 1 5

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 76

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro Arg Met Gly Val Ser
 1 5 10

20 <210> 77
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 77

30 His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Lys Leu Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción Sintética

40 <400> 78

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu
 1 5 10

45 <210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 79

Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

55 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 904 593 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 80

5 Ser Asn Ala Arg Met Gly Val Ser
 1 5

<210> 81
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

15 <400> 81

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala Arg
 1 5

20 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 82

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala Arg Met Gly Val Ser
 1 5 10

30 <210> 83
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción Sintética

40 <400> 83

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

50 <400> 84

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Ile
 1 5 10

55 <210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 85

5 Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 86

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

15 <400> 86

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Arg Gly
1 5 10 15

<210> 87

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción Sintética

<400> 87

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr
1 5 10

30

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 88

40

Asn Asn Ala Arg Met Gly Val Ser
1 5

<210> 89

<211> 8

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

50

<400> 89

Gly Phe Ser Leu Asn Asn Ala Arg
1 5

55 <210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Construcción Sintética

ES 2 904 593 T3

<400> 95

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val Arg Met Gly Val Ser
 1 5 10

5 <210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 96

His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile Arg Arg Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

15 <210> 97
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción Sintética

25 <400> 97

His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Ile
 1 5 10

30 <210> 98
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 98

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Arg Leu Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15

40 <210> 99
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 99

50 Ser Asn Ala Lys Met Gly Val Ser
 1 5

55 <210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 100

ES 2 904 593 T3

His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Phe Leu Arg Ser
 1 5 10 15

5 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

10 <400> 106

His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Ser Leu Arg Gly
 1 5 10 15

15 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 107

Asp Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción Sintética

35 <400> 108

Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Glu Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 109
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 109

Ser Asp Ala Trp Met Ser
 1 5

50 <210> 110
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 110

60

ES 2 904 593 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Asp
1 5

5 <210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 111

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Ser
1 5 10

15 <210> 112
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 112

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Val Val Pro
1 5 10 15

25 Leu Asn Gly
<210> 113
<211> 13
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
35 <400> 113

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 114

Val Pro Gly Ser Tyr Gly Tyr
1 5

50 <210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Construcción Sintética

ES 2 904 593 T3

<400> 115

Ser Tyr Ala Trp Met Ser
1 5

5 <210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr
1 5

15 <210> 117
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

25 <400> 117

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala Trp Met Ser
1 5 10

30 <210> 118
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Construcción Sintética

<400> 118

Arg Ile Lys Ser Ile Ala Asp Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Arg Asn

40 <210> 119
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 119

50 Arg Ile Lys Ser Ile Ala Asp Gly Gly Ala Thr Asp Tyr
1 5 10

<210> 120
<211> 9
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 120

5 Ile Pro Gly Asn Asp Ala Phe Asp Met
 1 5

<210> 121
<211> 6
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

15 <400> 121

 Asn Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 122
20 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Construcción Sintética

<400> 122

 Gly Phe Ile Phe Asn Asn
 1 5

30 <210> 123
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 123

40 <210> 124
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética

50 <400> 124

 Arg Ile Lys Ser Lys Ser Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

 Val Lys Asp

55 <210> 125
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

5 <400> 125

Arg Ile Lys Ser Lys Ser Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 126
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

15 <400> 126

Ala Pro Gly Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5

20 <210> 127
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

30 <400> 127

Arg Ile Lys Ser Ile Thr Asp Gly Gly Val Ile Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Val Arg Asn

<210> 128
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción Sintética

40 <400> 128

Arg Ile Lys Ser Ile Thr Asp Gly Gly Val Ile Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción Sintética

55 <400> 129

Ile Pro Gly Asn Asp Asp Phe Asp Met
 1 5

<210> 130
 <211> 19

ES 2 904 593 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Construcción Sintética

<400> 130

10 Arg Ile Lys Ser Ile Asn Asp Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Val Arg Asn

<210> 131
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Construcción Sintética

<400> 131

Arg Ile Lys Ser Ile Asn Asp Gly Gly Ala Thr Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 132
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 132

Thr Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

35 <210> 133
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

45 <400> 133

Gly Phe Thr Phe Thr Asn
 1 5

50 <210> 134
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Construcción Sintética

<400> 134

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Ser
 1 5 10

ES 2 904 593 T3

Gly Asp Thr Phe Ser Ser Asn Ala Ile Ser
1 5 10

5 <210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 140

Val Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

15 <210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 141

Val Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 142

His Thr Tyr His Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Gly Ala Met Asp
1 5 10 15

Pro

40 <210> 143
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 143

Ser Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

50 <210> 144
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 144

5 Gly Phe Thr Phe Ser Asn
1 5

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

15 <400> 145

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 146

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción Sintética

<400> 146

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

Gly

30

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 147

40

Asp Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 148

<211> 14

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

50

<400> 148

Ala Gly Leu Leu Tyr Gly Gly Gly Val Tyr Pro Met Asp Ile
1 5 10

55 <210> 149

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 904 593 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

5 <400> 149

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

15 <400> 150

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

20 <210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 151

30 Val Gln Asp Thr His Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 152
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Construcción Sintética

40 <400> 152

Gln Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

45 <210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 153

Gly Gln Asp Thr His Phe Pro Leu Thr
 1 5

55 <210> 154
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 904 593 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 154

5

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Asp Lys Thr Tyr Thr Asn
 1 5 10 15

<210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

15

<400> 155

Glu Val Ser Lys Leu Asp Val
 1 5

20

<210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 156

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

30

<210> 157
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Construcción Sintética

40

<400> 157

Gly Ser Thr Ile Arg Ala Thr
 1 5

45

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 158

Gln Gln Tyr Ser Asp Trp Pro Phe Thr
 1 5

55

<210> 159
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 159

5 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Phe Ala
1 5 10

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

15 <400> 160

Gly Ala Thr Thr Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Construcción Sintética

<400> 161

Gln Gln Tyr Lys Asp Trp Pro Phe Thr
1 5

30 <210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 162

40 Arg Val Ser Gln Ser Ile Gly Ala Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 163
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

50 <400> 163

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

55 <210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Construcción Sintética

ES 2 904 593 T3

<400> 164

5 Gln Gln Tyr Ile Tyr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 165
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 165

15 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 166

25 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asp Leu Ala
1 5 10

30 <210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 167

40 Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 168

50 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 169
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Construcción Sintética

60 <220>
<223> Construcción Sintética

ES 2 904 593 T3

<400> 169

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Asn Phe Ala
1 5 10

5 <210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 170

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Asn Phe Ala
1 5 10

15 <210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

25 <400> 171

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Arg Asn Leu Ala
1 5 10

30 <210> 172
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 172

Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

40 <210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 173

50 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Asn Phe Ala
1 5 10

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

60 <400> 174

ES 2 904 593 T3

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly
1 5

5 <210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
10
<400> 180

Gln Glu Tyr Asn Asn Trp Pro Phe Thr
1 5

15 <210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 181

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

25 <210> 182
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Construcción Sintética

35 <400> 182

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Lys Arg Asn Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

40 <210> 183
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Construcción Sintética

<400> 183

Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

50 <210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 184
60

ES 2 904 593 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | Met | Gln | Ala | Gln | Gln | Thr | Pro | Ile | Thr | | | | | | | | |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 185 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 16 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Construcción Sintética | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <400> | 185 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Tyr | Ser | Asn | Gly | Lys | Asn | Tyr | Leu | Asp |
| | | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 15 | <210> | 186 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Construcción Sintética | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 186 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Leu | Gly | Ser | Asn | Arg | Ala | Ser | | | | | |
| 25 | | | | | | | 1 | | | | 5 | | | | | | | |
| | <210> | 187 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 16 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Construcción Sintética | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <400> | 187 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His | Arg | Asp | Gly | Phe | Asn | Tyr | Leu | Asp |
| | | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 40 | <210> | 188 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | <223> | Construcción Sintética | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 188 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Leu | Ala | Ser | Ser | Arg | Ala | Ser | | | | | |
| 50 | | | | | | | 1 | | | | 5 | | | | | | | |
| | <210> | 189 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Construcción Sintética | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 189 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 904 593 T3

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Ile Thr
 1 5

5 <210> 190
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

10 <400> 190

Arg Ser Thr Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

15 <210> 191
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 191

Leu Gly Ser Ile Arg Ala Ser
 1 5

25 <210> 192
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción Sintética

35 <400> 192

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Arg Arg Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

40 <210> 193
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 193

Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser
 1 5

50 <210> 194
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 194

60

ES 2 904 593 T3

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 200

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 201
<211> 943
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 201

ES 2 904 593 T3

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
20 25 30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
35 40 45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
50 55 60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
85 90 95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
100 105 110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115 120 125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130 135 140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165 170 175

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180 185 190

Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195 200 205

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys

ES 2 904 593 T3

Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
 500 505 510
 Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe
 515 520 525
 Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
 530 535 540
 Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
 545 550 555 560
 Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
 565 570 575
 Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
 580 585 590
 Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
 595 600 605
 Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
 610 615 620
 Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
 625 630 635 640
 Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
 645 650 655
 Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
 660 665 670
 Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala
 675 680 685
 Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
 690 695 700
 Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met
 705 710 715 720
 His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp
 725 730 735
 Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro
 740 745 750

ES 2 904 593 T3

Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu
755 760 765

Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp
770 775 780

Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln
785 790 795 800

Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
805 810 815

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys
820 825 830

Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu
835 840 845

Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr
850 855 860

Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val
865 870 875 880

Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His
885 890 895

Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys
900 905 910

Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala
915 920 925

Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
930 935 940

<210> 202

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (100)..(101)

15

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 202

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Leu Arg Leu Ser
 50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 203
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

15 <400> 203

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
 20 25 30

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

Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Ser

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> característica miscelánea

5 <222> (83)..(83)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (100)..(101)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 205

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Phe Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
20 25 30

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

Trp Leu Gly His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Leu Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Phe Xaa Met Thr Asn Met Asp Pro Gly Asp Pro Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 206

<211> 121

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

25 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (100)..(101)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

30 <400> 206

ES 2 904 593 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Pro
 20 25 30

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

Trp Phe Ala His Ile Phe Ser Thr Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Arg Gly Arg Leu Thr Val Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Leu Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 207
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 207

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

ES 2 904 593 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|--|--|
| | | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | | 30 | | | |
| Trp | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | |
| Gly | Arg | Ile | Lys | Ser | Lys | Thr | Xaa | Xaa | Gly | Thr | Thr | Asp | Tyr | Val | Val | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | |
| Pro | Leu | Asn | Gly | Arg | Phe | Ile | Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Arg | Asn | Thr | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | | | |
| Leu | Tyr | Leu | Gln | Leu | Asn | Asn | Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Tyr | Cys | Thr | Thr | Val | Pro | Gly | Ser | Tyr | Gly | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |
| Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 115 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

5 <210> 208
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Glu | Val | Asn | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Glu | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Tyr | Ala | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | | |
| Trp | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | |
| Gly | Arg | Ile | Lys | Ser | Ile | Ala | Xaa | Xaa | Gly | Ala | Thr | Asp | Tyr | Ala | Ala | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | |
| Pro | Val | Arg | Asn | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Arg | Asn | Thr | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | | | |
| Leu | Tyr | Leu | Glu | Met | His | Ser | Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Tyr | Cys | Thr | Thr | Ile | Pro | Gly | Asn | Asp | Ala | Phe | Asp | Met | Trp | Gly | Gln | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |
| Gly | Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | | | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | | | | | | | |

ES 2 904 593 T3

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Ile Thr Xaa Xaa Gly Val Ile Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Arg Asn Arg Cys Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Glu Met His Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Ile Pro Gly Asn Asp Asp Phe Asp Met Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Arg Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (33)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 211

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

<210> 212
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción Sintética

 10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (33)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

 15 <400> 212

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

 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30

 Xaa Xaa Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

 Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

 20 <210> 213
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Construcción Sintética

 <220>
 30 <221> característica miscelánea
 <222> (33)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

 <400> 213
 35

ES 2 904 593 T3

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

- <210> 214
- <211> 120
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (56)..(57)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- 15 <400> 214

ES 2 904 593 T3

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Ile Asn Xaa Xaa Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Ser
 50 55 60

Pro Val Arg Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Glu Met His Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Ile Pro Gly Asn Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 215
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (33)..(34)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 215

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Xaa Xaa Lys Asn Tyr Leu Asp Trp Phe Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ile Asp Phe Ile Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Gln Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

- <210> 216
- <211> 119
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción Sintética
- 10 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (56)..(57)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- 15 <400> 216

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Ala Pro Gly Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 20 <210> 217
- <211> 126
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (114)..(115)
- 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 217

ES 2 904 593 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Gly Val Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Thr Tyr His Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Gly Ala
 100 105 110

Met Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 218

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

10

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (62)..(63)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

15

<400> 218

ES 2 904 593 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Xaa Xaa Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Gly Leu Leu Tyr Gly Gly Gly Val Tyr Pro Met Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

5 <210> 219
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 219

Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

20 <210> 220
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 220

Xaa Xaa Ser Asn Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 221
 <211> 11

ES 2 904 593 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2)

10

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 221

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Ser | Asn | Tyr | Gly | Gly | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

15

<210> 222
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2)

25

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 222

30

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Ser | Asp | Tyr | Glu | Gly | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

35

<210> 223
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

40

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2)

45

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 223

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Ser | Asn | Tyr | Glu | Glu | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

50

<210> 224
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(8)

60

<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 224

ES 2 904 593 T3

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr Val Val Pro
1 5 10 15

Leu Asn Gly

- 5 <210> 225
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (7)..(8)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 225

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr
1 5 10

- 20 <210> 226
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Construcción Sintética
- <220>
- 30 <221> característica miscelánea
- <222> (7)..(8)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 226
- 35

Arg Ile Lys Ser Ile Ala Xaa Xaa Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Arg Asn

- 40 <210> 227
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (7)..(8)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- 50 <400> 227

Arg Ile Lys Ser Ile Ala Xaa Xaa Gly Ala Thr Asp Tyr
1 5 10

- 55 <210> 228
- <211> 19
- <212> PRT

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

5 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

10 <400> 228

Arg Ile Lys Ser Lys Ser Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Asp

15 <210> 229
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética

<220>
<221> característica miscelánea

25 <222> (7)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 229

Arg Ile Lys Ser Lys Ser Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 230
<211> 19
<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

45 <400> 230

Arg Ile Lys Ser Ile Thr Xaa Xaa Gly Val Ile Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Arg Asn

50 <210> 231
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Construcción Sintética

<220>

<221> característica miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

5 <400> 231

Arg Ile Lys Ser Ile Thr Xaa Xaa Gly Val Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 232
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 232

Arg Ile Lys Ser Ile Asn Xaa Xaa Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Val Arg Asn

25 <210> 233
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción Sintética

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

40 <400> 233

Arg Ile Lys Ser Ile Asn Xaa Xaa Gly Ala Thr Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 234
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

55 <400> 234

ES 2 904 593 T3

Arg Ile Lys Ser Lys Ile Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Val Lys Gly

- <210> 235
- <211> 13
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (7)..(8)
- 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 235

Arg Ile Lys Ser Lys Ile Xaa Xaa Gly Thr Thr Asp Tyr
 1 5 10

- 20 <210> 236
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Construcción Sintética
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 30 <222> (16)..(17)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- <400> 236

His Thr Tyr His Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Gly Ala Met Xaa
 1 5 10 15

- 35 Xaa
- <210> 237
- <211> 17
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción Sintética
- 45 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (13)..(14)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural
- 50 <400> 237

Asp Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Xaa Xaa Val Lys
 1 5 10 15

Gly

- 55 <210> 238

ES 2 904 593 T3

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

5 <220>
 <223> Construcción Sintética

<220>
 <221> característica miscelánea

10 <222> (10)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

<400> 238

15 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Xaa Xaa Lys Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 239
 <211> 16
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoazúcar que se produce de forma natural

30 <400> 239

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg Xaa Xaa Phe Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 240
 <211> 121
 <212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

40 <400> 240

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

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

ES 2 904 593 T3

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Pro Ser Tyr Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 241
- <211> 112
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción Sintética
- 10 <400> 241

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Val
 20 25 30

Arg Ser Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asp Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

- 15 <210> 242
- <211> 363
- <212> **ADN**
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Construcción Sintética
- <400> 242

ES 2 904 593 T3

```

gaagtccaac ttgtogaatc gggaggaggc cttgtgcaac ccggtggatc cctgaggctg      60
tcatgcgcgg cctcgggctt caccttttcc gattactaca tgacctgggt cagacaggcc      120
cctggaaagg ggttggaatg ggtggcattc atccggaata gagcccgcgg atacacttcc      180
gaccacaacc ccagcgtgaa ggggcggttc accattagcc gcgacaacgc caagaactcc      240
ctctacctcc aaatgaacag cctgcgggcg gaggataaccg ctgtgtacta ctgcgcccgc      300
gaccggccgt cctactatgt gctggactac tggggccagg gtactacggt caccgtctcc      360
tca                                                                              363
<210> 243
<211> 336
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
10 <400> 243

gacattgtga tgactcaatc ccccgactcc ctggctgtgt ccctcggcga acgcgcaact      60
atcaactgta aaagcagcca gtcctgttc aacgtccggt cgaggaagaa ctacctggcc      120
tggatcagc agaaaacctg gcagccgcgc aagcttotga tctcatgggc ctcaactcgg      180
gaaagcggag tgccagatag attctccgga tctggctccg gaaccgactt caccctgacg      240
atttcgagct tgcaagcggg ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagtc ctacgacctc      300
ttcacctttg gttcgggcac caagctggag atcaaa                                     336

15 <210> 244
   <211> 6
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

20 <220>
   <223> Construcción Sintética

   <400> 244

                                     Ser Asp Tyr Tyr Met Thr
25                                     1           5

<210> 245
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

35 <400> 245

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

40 <210> 246
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>

```

ES 2 904 593 T3

<223> Construcción Sintética

<400> 246

5 Phe Ile Arg Asn Arg Ala Arg Gly Tyr Thr Ser Asp His
1 5 10

<210> 247

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

15 <400> 247

Phe Ile Arg Asn Arg Ala Arg Gly Tyr Thr Ser Asp His Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 248

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción Sintética

<400> 248

Asp Arg Pro Ser Tyr Tyr Val Leu Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 249

<211> 17

<212> **PRT**

<213> Secuencia **Artificial**

35

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 249

40

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Val Arg Ser Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 250

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

50

<400> 250

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

55 <210> 251

<211> 8

ES 2 904 593 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 251

Lys Gln Ser Tyr Asp Leu Phe Thr
 1 5

10 <210> 252
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 252

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

ES 2 904 593 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

5

<400> 253

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aatgtctgtg tcaggtgccc aaggtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg cgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggt a cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaaggcct cccatcctcc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacocca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc      960
tcctgtctc cgggtaaa

```

10

<210> 254

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 254

20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

ES 2 904 593 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 255
 <211> 978
 5 <212> **ADN**
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 255

```
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctgggcacct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgtgagg tcgagtgcc cagagtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg ccgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtc cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggtgta acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccatctccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgca ggtcaaagc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg gcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaa      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc      960
tcctgtctc cgggtaaa      978
```

15 <210> 256
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 256

ES 2 904 593 T3

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

5 <210> 257
 <211> 324
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

<400> 257
 ggaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctggttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tgggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag 300
 10 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

15 <210> 258
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

20 <400> 258

Leu Gln Gly Leu Leu Gln Gly Gly
 1 5

25 <210> 259
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 259

ES 2 904 593 T3

Leu Leu Gln Gly
1

5 <210> 260
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 260

Leu Ser Leu Ser Gln Gly
1 5

15 <210> 261
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 261

Gly Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly
1 5

30 <210> 262
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
35 <400> 262

Gly Leu Leu Gln Gly
1 5

40 <210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 263

Leu Leu Gln Gly Ser Pro Leu Ala Gln Ser His Gly Gly
1 5 10

50 <210> 264
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 264

60

ES 2 904 593 T3

Gly Leu Leu Gln Gly Gly Gly
1 5

5 <210> 265
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
10
<400> 265

Gly Leu Leu Gln Gly Gly
1 5

15 <210> 266
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 266

Gly Leu Leu Gln
1

25

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
35 <400> 267

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

40 <210> 268
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Construcción Sintética

<400> 268

Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

50 <210> 269
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 269
60

ES 2 904 593 T3

Leu Leu Gln Tyr Gln Gly Ala
1 5

5 <210> 270
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 270

Leu Leu Gln Gly Ser Gly
1 5

15 <210> 271
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 271

Leu Leu Gln Tyr Gln Gly
1 5

25 <210> 272
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 272

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly
1 5

35 <210> 273
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 273

Ser Leu Leu Gln Gly
1 5

45 <210> 274
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 274

60

ES 2 904 593 T3

Leu Leu Gln Leu Gln
1 5

5 <210> 275
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

10 <400> 275

Leu Leu Gln Leu Leu Gln
1 5

15 <210> 276
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 276

Leu Leu Gln Gly Arg
1 5

25

<210> 277
<211> 6
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

35 <400> 277

Leu Leu Gln Gly Pro Pro
1 5

40 <210> 278
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Construcción Sintética

<400> 278

Leu Leu Gln Gly Pro Ala
1 5

50 <210> 279
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 279

60

ES 2 904 593 T3

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Pro Pro
1 5

5 <210> 280
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción Sintética
10
<400> 280

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

15 <210> 281
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 281

Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys
1 5

25 <210> 282
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Construcción Sintética

35 <400> 282

Leu Leu Gln Gly Pro Gly
1 5

40 <210> 283
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Construcción Sintética

<400> 283

Leu Leu Gln Gly Pro
1 5

50 <210> 284
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Construcción Sintética

<400> 284
60

ES 2 904 593 T3

Leu Leu Gln Pro
1

5 <210> 285
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 285

Leu Leu Gln Pro Gly Lys
1 5

15 <210> 286
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 286

Leu Leu Gln Ala Pro Gly Lys
1 5

25 <210> 287
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 287

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly
1 5

35 <210> 288
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 288

Leu Leu Gln Gly Ala Pro
1 5

45 <210> 289
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 289

55

60

ES 2 904 593 T3

Leu Leu Gln Leu Gln Gly
1 5

<210> 290
<211> 326
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 290

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

ES 2 904 593 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | 115 | | | | | 120 | | | | | | | | 125 | | | |
| Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | |
| Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | | | | |

<210> 292
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 292

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

ES 2 904 593 T3

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que se une específicamente a la Variante III del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFRvIII), en donde el anticuerpo comprende:
- 5 (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 74, 75 o 76; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 77 o 78; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 79; y
- 10 una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 156; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 157; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 158; o
- 15 (b) o una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 80, 81 o 82; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 83 o 84; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 85; y
- 20 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 159; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 160; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 161; o
- 25 (c) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 80, 81 o 82; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 86 o 87; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 79; y
- 30 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 162; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 163; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 164; o
- 35 (d) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 88, 89 o 90; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 91 o 92; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 85; y
- 40 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 165; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 163; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 161; o
- 45 (e) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 93, 94 o 95; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 96 o 97; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 79; y
- 50 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 166; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 163; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 167; o
- 55 (f) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 93, 94 o 95; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 96 o 97; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 85; y
- 60 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 168; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 163; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 167; o
- 65 (g) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 80, 81 o 82; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 83 o 84; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 85; y
- una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 169; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 163; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 161; o
- (h) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 80, 81 o 82; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 83 o 84; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 85; y

- una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 182; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 183; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 184; o
- 5 (q) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 115, 116 o 117; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 118 o 119; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 120; y
- 10 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 185; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 186; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 184; o
- 15 (r) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 121, 122 o 123; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 124 o 125; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 126; y
- 20 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 187; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 188; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 189; o
- (s) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 115, 116 o 117; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 127 o 128; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 129; y
- 25 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 185; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 186; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 184; o
- 30 (t) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 115, 116 o 117; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 130 o 131; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 120; y
- 35 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 190; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 191; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 184; o
- (u) una región VH que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 132, 133 o 134; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 135 o 136; y (iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 126; y
- 40 una región VL que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 192; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 193; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 194.
- 45 2. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
- (a) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9; y
- 50 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10; o
- (b) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11; y
- una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12; o
- 55 (c) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13; y
- una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14; o
- (d) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15; y
- 60 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16; o
- (e) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17; y
- 65 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 18; o

- (f) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 19; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20; o
- 5 (g) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 21; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 22; o
- 10 (h) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 23; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 24; o
- (i) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 25; y
15 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 26; o
- (j) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 25; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29; o
- 20 (k) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 27; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28; o
- 25 (l) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31; o
- (m) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32; y
30 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 33; o
- (n) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 34; y
35 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31; o
- (o) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 35; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 36; o
- 40 (p) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 37; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 38; o
- 45 (q) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 39; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40; o
- 50 (r) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 41; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 42; o
- (s) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 43; y
55 una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40; o
- (t) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 44; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 45; o
- 60 (u) una región VH que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 46; y
una región VL que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 47.
- 65 3. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa que comprende, además, un segundo

dominio variable de anticuerpo capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmunitaria humana.

- 5 4. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, en donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa que comprende, además, un segundo dominio variable de anticuerpo capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmunitaria humana.
- 10 5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en donde el anticuerpo biespecífico comprende modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225 y 228 en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (esquema de numeración de la UE) en la región CH3 de una IgG2 humana (SEQ ID NO: 290); opcionalmente
- 15 que comprende, además, una modificación de aminoácidos en una o más de las posiciones 265, 330 y 331 de la IgG2 humana.
- 20 6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una etiqueta que contiene glutamina donante de acilo modificada en un sitio específico; o en donde el anticuerpo comprende un enlazador.
- 25 7. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7 o el vector de la reivindicación 8.
- 30 10. Un conjugado del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 6, en donde el anticuerpo se conjuga con un agente, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente formador de imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero y un oligonucleótido.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o el conjugado de la reivindicación 10.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el conjugado de la reivindicación 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso como un medicamento.
- 40 13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el conjugado de la reivindicación 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso en el tratamiento de: cáncer; una afección asociada con células malignas que expresan EGFRvIII; crecimiento, progresión o metástasis del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan EGFRvIII; o un cáncer relacionado con EGFRvIII, seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, carcinoma del plexo coroideo, carcinoma anaplásico, pineoblastoma, pineocitoma, meningioma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supraentorial, tumor teratoide/rabdoide atípico, glioma mixto, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de
- 45 células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, meduloblastoma, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer cervical, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de tiroides, mesotelioma, cáncer de útero, linfoma y leucemia.
- 50 14. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones que dan como resultado la producción del anticuerpo o anticuerpo biespecífico, y aislar el anticuerpo o anticuerpo biespecífico de la célula huésped o el cultivo.

FIG. 1A

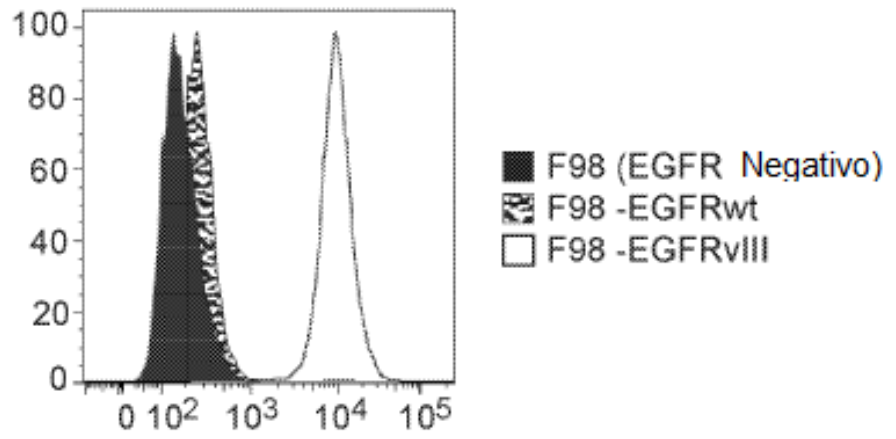


FIG. 1B

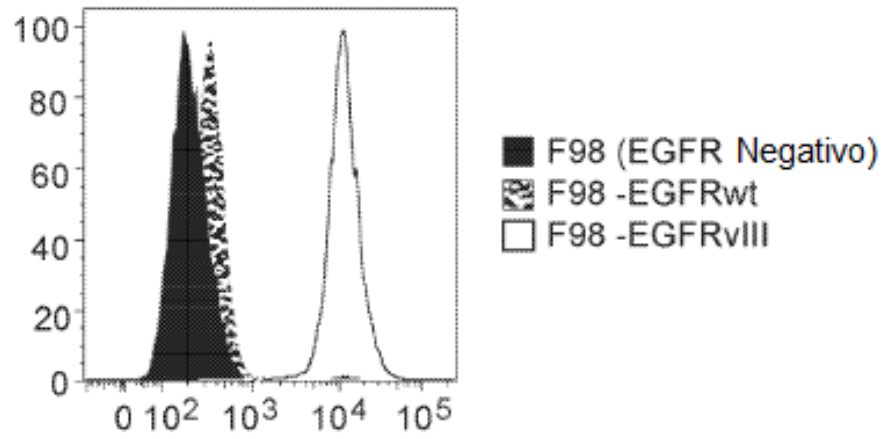


FIG. 1C

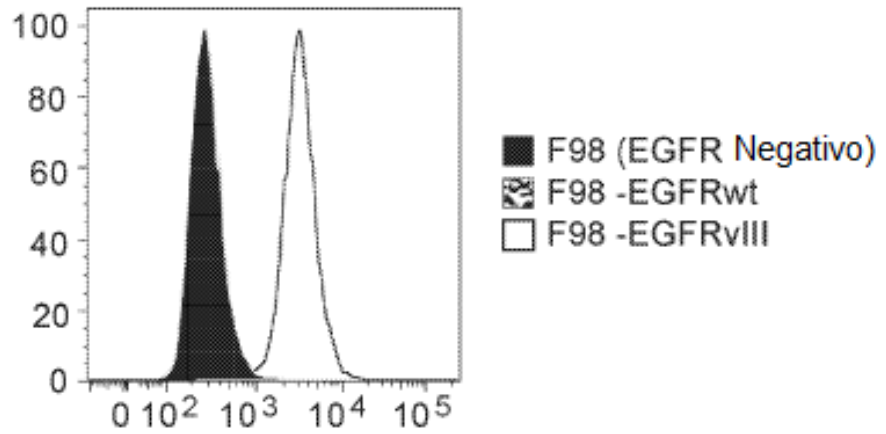


FIG. 2A

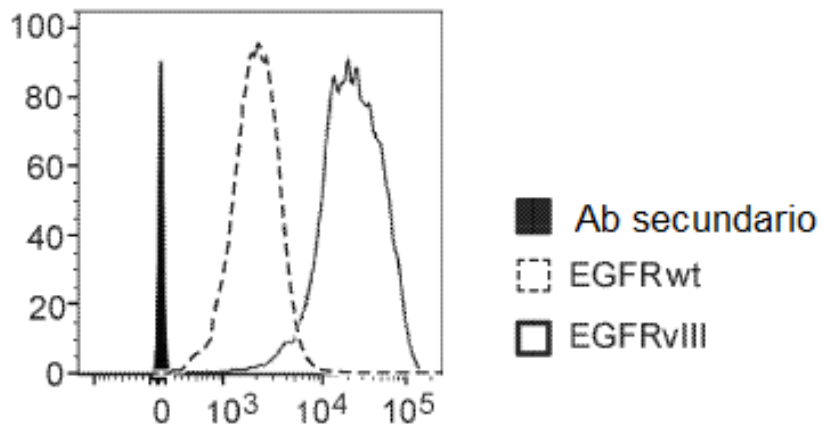


FIG. 2B

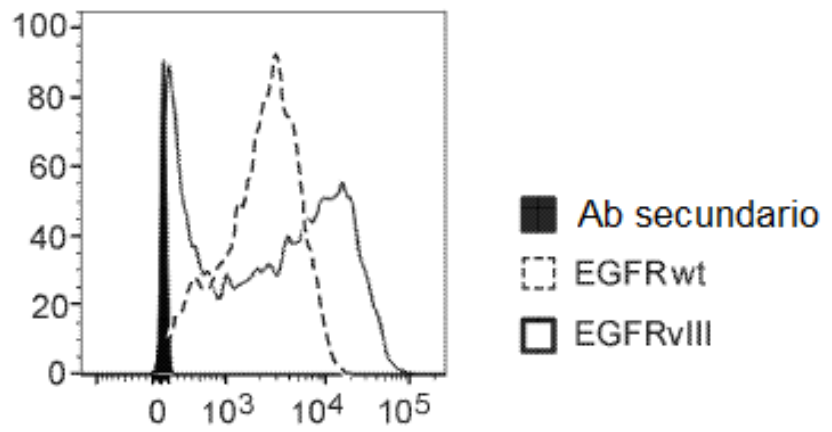


FIG. 2C

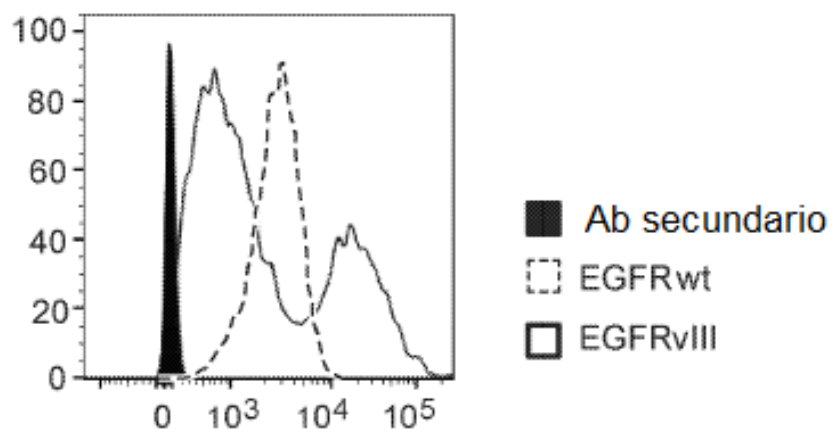


FIG. 3A

LN18-EGFRvIII

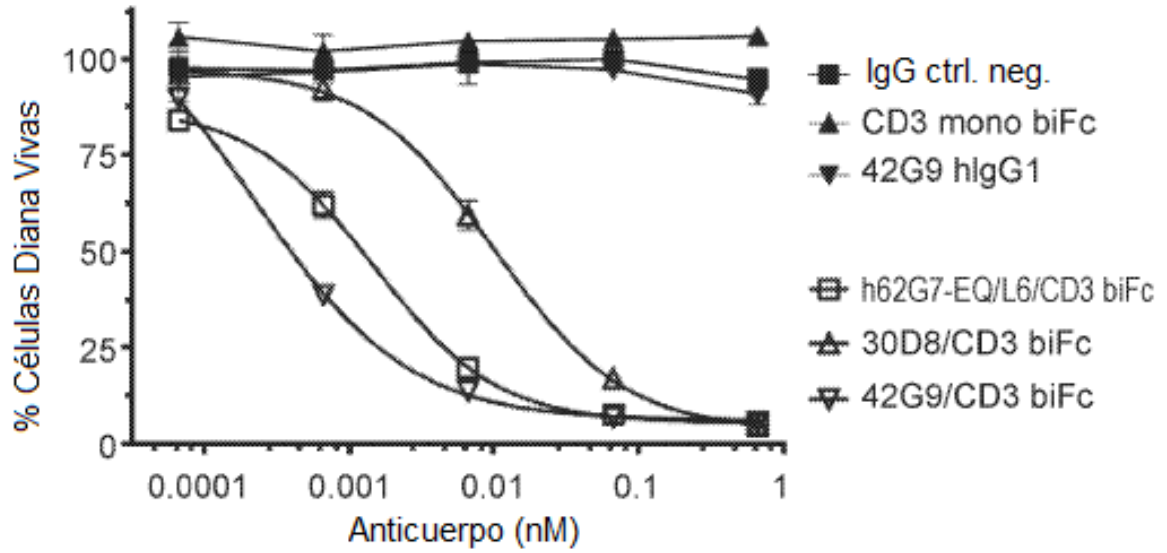


FIG. 3B

LN18

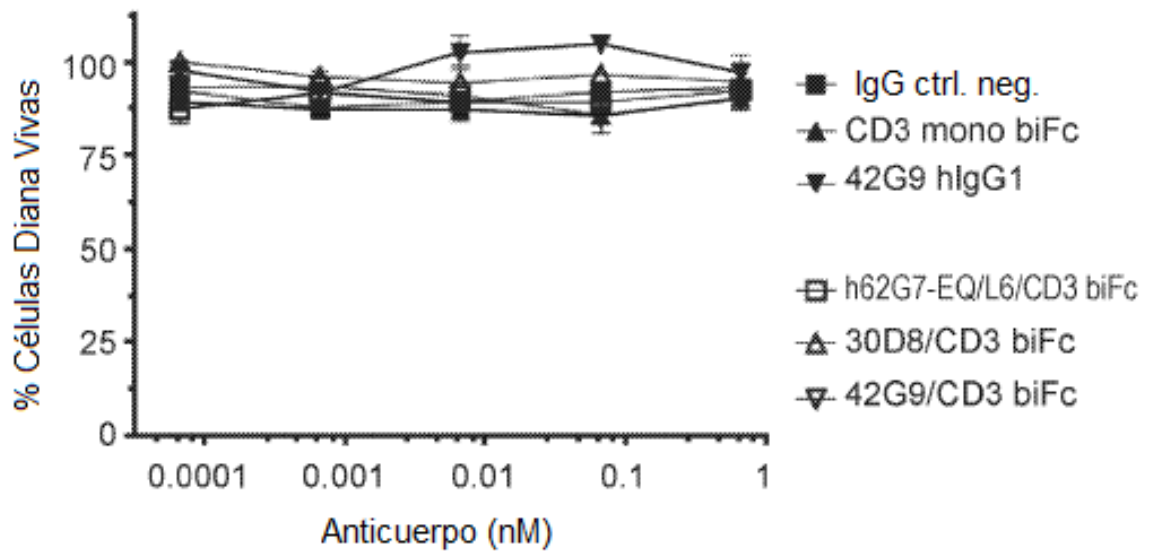


FIG. 4A
LN229-EGFRvIII

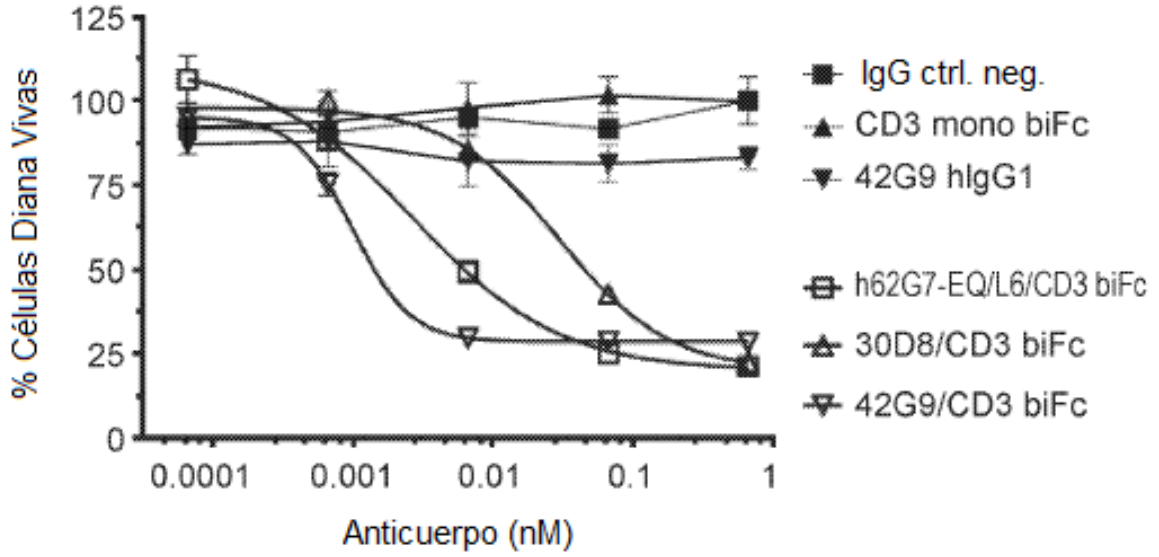


FIG. 4B
LN229

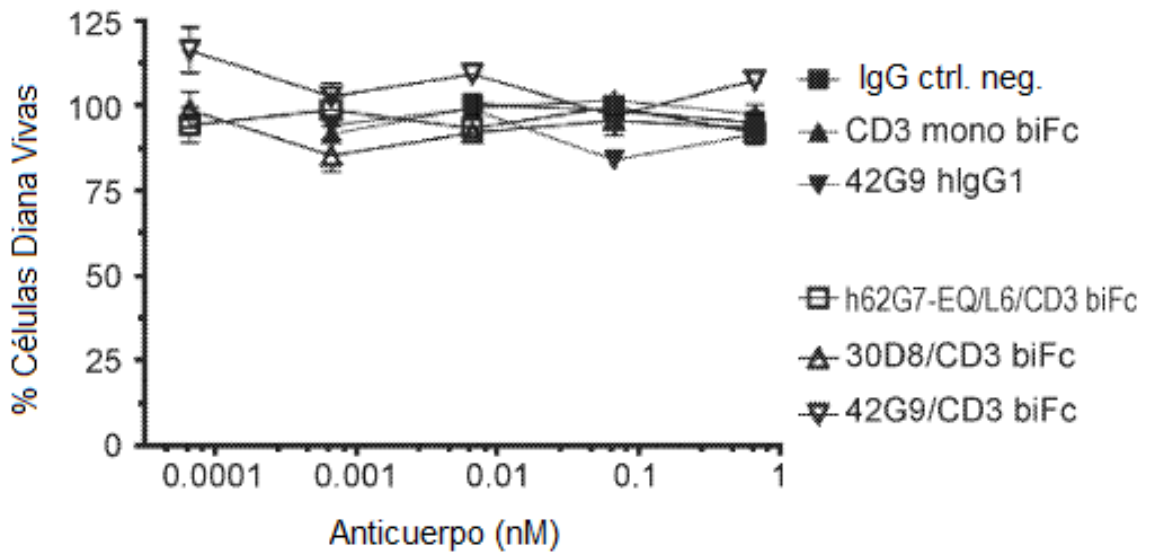


FIG. 5

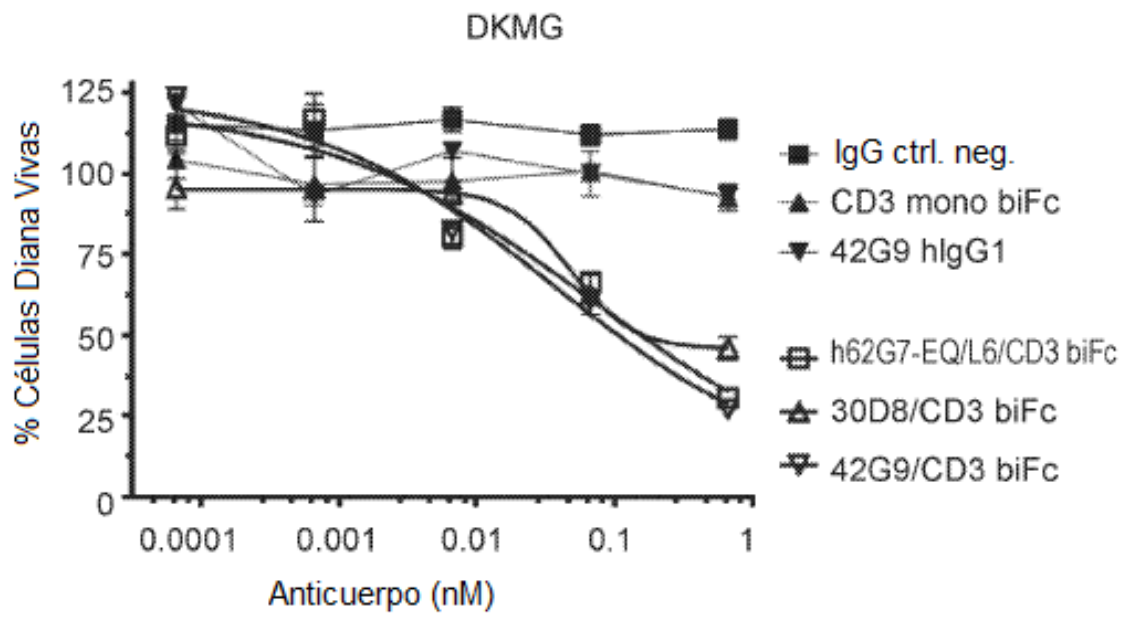


FIG. 6

LN229-EGFRvIII

