

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 274**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015 PCT/US2015/042986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015 E 15753531 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3177314**

54 Título: **Inmunoterapia con células T específica para WT-1**

30 Prioridad:

04.08.2014 US 201462033045 P

21.05.2015 US 201562164783 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2021

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)**

**1100 Fairview Avenue North
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**SCHMITT, THOMAS, M.;
GREENBERG, PHILIP, D. y
NGUYEN, HIEU**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 841 274 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

Inmunoterapia con células T específica para WT-1

5 **Declaración de interés del gobierno**

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la subvención n.º P01 CA18029 concedida por los Institutos Nacionales de Salud / Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno tiene determinados derechos sobre esta invención.

10 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/033.045 presentada el 4 de Agosto de 2014 y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/164.783 presentada el 21 de mayo de 2015.

15 **Declaración con respecto a la lista de secuencias**

La lista de secuencias asociada con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel. El nombre del archivo de texto que contiene la lista de secuencias es 360056_427WO_SEQUENCE_LISTING.txt. El archivo de texto pesa 138 KB, se creó el 29 de julio de 2015 y se presenta electrónicamente a través de EFS-Web.

Antecedentes

Campo técnico

25 La presente divulgación se refiere, en general, a receptores de células T (TCR) de alta afinidad o afinidad potenciada específicos para antígenos asociados con una enfermedad hiperproliferativa. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a TCR con alta afinidad o afinidad potenciada contra un epítipo de proteína 1 de tumor de Wilms (WT-1) humana, a células T que expresan tales TCR específicos de WT-1, a ácidos nucleicos que codifican para los mismos y a composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que las células sobreexpresan WT-1, tal como en cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

35 La terapia génica con receptores de células T (TCR) es un enfoque de tratamiento emergente diseñado para superar los obstáculos asociados con la inmunoterapia adoptiva de células T convencional, tales como el tiempo y la mano de obra extensos requeridos para aislar, caracterizar y expandir las células T específicas de antígeno tumoral (Schmitt *et al.*, Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009). Otro obstáculo es que la mayoría de antígenos tumorales identificados que pueden seleccionarse como diana mediante inmunoterapia con células T convencional son autoproteínas sobreexpresadas, por lo que, en general, se eliminan células T de alta afinidad específicas para estos antígenos durante la selección tímica y son raras o inexistentes en el repertorio periférico.

45 Están desarrollándose estrategias para potenciar la afinidad de los TCR destinados para su uso en terapia génica con TCR (Udyavar *et al.*, J. Immunol. 182:4439, 2009; Zhao *et al.*, J. Immunol. 179:5845, 2007; Richman y Kranz, Biomol. Eng. 24:361, 2007). Estos enfoques implican generalmente la generación de bibliotecas de genes de TCR mutados y la posterior selección de mutaciones que otorgan mayor afinidad para el complejo del péptido diana con el ligando del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las mutaciones se dirigen habitualmente a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que se sabe que interactúan con el péptido (CDR3) y/o CMH (CDR1/2) (Wucherpfennig *et al.*, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140, 2010). No obstante, cambios a los residuos de contacto del CMH pueden crear un riesgo en el entorno clínico, ya que esto puede aumentar la afinidad por el CMH independientemente del péptido o aumentar la probabilidad de reactividad cruzada (efectos fuera de la diana). Se ha destacado este concepto por los resultados de un ensayo, en el que se infundieron células T que expresan un TCR que contiene mutaciones de CDR2 en pacientes y mediaron en una toxicidad rápida y mortal a partir de una reactividad cruzada impredecible con un autoantígeno distinto expresado en el corazón (Cameron *et al.*, Sci. Transl. Med. 5:197ra103, 2013; Linette *et al.*, Blood 122:863, 2013). Determinadas metodologías disponibles usadas para seleccionar como diana residuos de CDR específicos para la sustitución de aminoácidos limitan la diversidad de las bibliotecas generadas, ya que estas están limitadas generalmente por la longitud de la secuencia de CDR parental. En cambio, el proceso natural produce generalmente una mayor diversidad en el timo, en el que la maquinaria de recombinación V(D)J activa durante el desarrollo de células T da como resultado reordenamientos de los genes del TCR que generan CDR muy diversas, particularmente CDR3, que varían tanto en la longitud como en la composición de aminoácidos.

65 Una estrategia para la terapia dirigida con células T, que logra un efecto clínico máximo que se vería acompañado por una toxicidad inmunológica mínima, implica identificar antígenos asociados a la enfermedad con alta expresión en y presentación por, por ejemplo, un compartimento de células malignas, pero sin expresión significativa en tejido normal. Por ejemplo, se han descrito varios antígenos asociados a leucemia mielógena aguda (LMA), y se ha demostrado que

la proteína 1 de tumor de Wilms (WT-1) se expresa en el compartimento de células madre de leucemia (LSC) de la mayoría de pacientes con LMA a niveles significativamente mayores que en células madre hematopoyéticas (HSC) fisiológicas. WT-1 está seleccionándose como diana en ensayos clínicos tanto con transferencia adoptiva de células T como con vacunación con péptidos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 7.342.092; 7.608.685; 7.622.119). Además, se ha notificado que la expresión de WT-1 es un marcador de enfermedad residual mínima porque los niveles de transcripción aumentados en pacientes con LMA en remisión morfológica era predictivo de recidiva clínica manifiesta (Inoue *et al.*, Blood 84:3071, 1994; Ogawa *et al.*, Blood 101:1698, 2003).

Dado que WT-1 es una proteína intracelular (habitualmente nuclear), las inmunoterapias que seleccionan como diana WT-1 usan generalmente enfoques celulares que tienen como objetivo generar respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ específicos de WT-1 que reconocen péptidos presentados en la superficie celular por moléculas de CMH de clase I. Para la inducción de una respuesta de CTL, las proteínas intracelulares se degradan habitualmente por el proteasoma o endo/lisosomas, uniéndose los fragmentos peptídicos resultantes a moléculas de CMH de clase I o clase II. Estos complejos de péptido-CMH se presentan en la superficie celular en la que se unen mediante células T por medio de la interacción péptido-CMH-TCR. Pueden usarse péptidos derivados de la proteína WT-1 en una vacuna en humanos para inducir células T CD8⁺ citotóxicas restringidas por antígeno leucocitario humano (HLA) que son capaces de destruir células tumorales. Sin embargo, dado que WT-1 es una autoproteína, tal inmunización sólo puede provocar respuestas por células T con TCR de baja afinidad. Además, los anticuerpos contra WT-1 son detectables en pacientes con neoplasias malignas hematopoyéticas y tumores sólidos, que demuestran que WT-1 puede ser un antígeno altamente inmunogénico (Gaiger *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (supl. 3):761, 2001).

De manera clara, existe la necesidad de terapias génicas con TCR alternativas para su uso como inmunoterapias que seleccionan como diana WT-1 altamente específicas dirigidas contra diversos cánceres, tales como leucemia y tumores. Las realizaciones de la presente divulgación abordan esta necesidad y proporcionan otras ventajas relacionadas.

Breve resumen

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado, estando el polinucleótido con codones optimizados, que codifica para una proteína de unión que comprende: (a) un dominio variable de cadena α (V_α) de receptor de células T (TCR) que tiene la secuencia de región determinante de complementariedad (CDR1) de aminoácidos de SEQ ID NO.:23, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de SEQ ID NO.:24 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de una cualquiera de las SEQ ID NO.:25 y 26; y (b) un dominio variable de cadena β (V_β) de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de CDR1 de SEQ ID NO.:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de SEQ ID NO.:28 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de SEQ ID NO.:29, en el que la proteína de unión codificada es capaz de (i) unirse específicamente a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):antígeno leucocitario humano (HLA) en una superficie celular independientemente o en ausencia de CD8 y/o (ii) unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 con una K_d menor de o igual a aproximadamente 8 nM.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una secuencia de control de la expresión, en el que el vector es un vector viral.

La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante, que comprende un polinucleótido aislado según la presente invención o un vector de expresión según la presente invención, en la que la célula huésped expresa en su superficie celular la proteína de unión codificada por el polinucleótido.

La presente invención también proporciona la célula huésped recombinante de la presente invención para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.

En las reivindicaciones se proporcionan realizaciones adicionales de la invención.

En el presente documento se divulga una proteína de unión (por ejemplo, una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas, un TCR o similares) que tiene (a) un dominio variable de cadena α (V_α) que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en SEQ ID NO.:23, una secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en SEQ ID NO.:24 y una secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO.:25, 26, 32, 38, 44, 50 y 51 y/o un dominio variable de cadena β (V_β); o (b) un dominio V_α de (a) y un dominio V_β que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en SEQ ID NO.:27, una secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en SEQ ID NO.:28 y/o una secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en SEQ ID NO.:29; en la que la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo péptido derivado de WT-1:antígeno leucocitario humano (HLA) con alta afinidad, tal como un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):antígeno leucocitario humano (HLA), por ejemplo, con una K_d menor de o igual a aproximadamente 8 nM.

En determinados casos, la proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas comprende (a) un dominio variable de cadena α (V_α) que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO.:1 ó 2 y/o un dominio variable de cadena β (V_β); o

(b) un dominio V_{α} y un dominio V_{β} que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9; o (c) un dominio V_{α} de (a) y/o un dominio V_{β} de (b); en la que la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM.

En otro aspecto, se proporciona un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad, que comprende una cadena α y una cadena β , en el que la cadena α comprende un dominio V_{α} que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, en el que el TCR se une a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 independientemente o en ausencia de CD8.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar un trastorno hiperproliferativo, que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesita una composición que comprende una cualquiera de las proteínas de unión o los TCR recombinantes de alta afinidad mencionados anteriormente específicos para la proteína 1 de tumor de Wilms (WT-1) humana. En aún otro aspecto, se proporciona un método de inmunoterapia adoptiva para tratar un estado caracterizado por la sobreexpresión de WT-1 en células de un sujeto que tiene un trastorno hiperproliferativo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula huésped recombinante que expresa cualquiera de las proteínas de unión o los TCR recombinantes de alta afinidad mencionados anteriormente.

En determinados casos, los métodos proporcionados son para tratar un trastorno hiperproliferativo que es una neoplasia maligna hemática o un cáncer sólido. Por ejemplo, la neoplasia maligna hemática que va a tratarse puede ser leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia eosinofílica crónica (LEC), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma no Hodgkin (LNH) o mieloma múltiple (MM). El cáncer sólido a modo de ejemplo que va a tratarse puede ser cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, carcinoma de huesos y tejidos blandos, tumor de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, adenocarcinoma colorrectal, cáncer colorrectal, tumor desmoide, cáncer embrionario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multiforme, tumor ginecológico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal de páncreas, tumor astrocítico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdoidesarcoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinativas de testículo, cáncer urotelial, sarcoma uterino o cáncer de útero.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra curvas de unión en equilibrio de una titulación de TCR específicos de WT-1 que se unen a tetrámeros de péptido de WT-1:HLA-A. Se generaron clones de células T específicos para WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ (que tiene la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL, tal como se expone en SEQ ID NO.:16) a partir del repertorio periférico de más de 50 donantes y se analizaron varios clones de células T de alta afinidad candidatos para determinar su afinidad relativa. Se tiñó cada clon de células T específico de WT-1 con tetrámeros de péptido de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴/CMH ("tetrámeros de WT-1") y se analizaron mediante citometría de flujo, y se determinó la intensidad de fluorescencia media de la tinción con tetrámero usando el software FlowJo (Treestar). Se realizaron mediciones de K_D usando diluciones al 50% de tetrámeros conjugados con PE a un intervalo de concentraciones (1-33 nM). Se determinaron los valores de K_D aparente a partir de las curvas de unión mediante regresión no lineal como la concentración de ligando que produjo una unión semimáxima ($B_{máx}$).

Las figuras 2A y 2B muestran que los clones de TCR de alta afinidad evaluados pudieron competir eficazmente con las cadenas de TCR endógenas y unir tetrámeros de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ independientemente de CD8. Se generaron constructos TCR α -P2A- β con codones optimizados que contenían las cadenas TCR α y TCR β de los tres TCR generados a partir de los repertorios periféricos que tienen la mayor afinidad por este epítipo de WT-1 (C4, P1, P22). (A) Se transdujeron estos constructos en PBMC y se evaluó el porcentaje de células teñidas con tetrámeros de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ dentro de la población transducida de células mediante citometría de flujo, representándose la tinción con tetrámero en el eje Y y representándose la tinción de la cadena β transgénica respectiva en el eje X. Se calculó la población transducida como el porcentaje total de células que expresan la cadena TCR β transgénica menos el porcentaje de células T que expresan de manera endógena esa cadena TCR β en un cultivo sin transducir de las mismas PBMC. (B) Se evaluó la unión de tetrámeros por los diferentes TCR en ausencia de CD8 midiendo la tinción con tetrámero de WT-1 en células CD4⁺ (negativas para CD8, CD8⁻) transducidas frente a células CD8⁺ dentro de la población transducida de PBMC. Uno de los clones de TCR, C4, mostró el mayor grado de unión de tetrámeros en células CD4⁺CD8⁻.

Las figuras 3A-3C muestran una comparación de la expresión en superficie de TCR para diversos constructos de TCR derivados de C4 diferentes. Tres constructos de TCR derivados de C4 diferentes, cada uno con un elemento 2A del teschovirus porcino (P2A) que se une a las cadenas α y β , tienen las siguientes características: (1) C4 α -P2A- β (C4 $\alpha\beta$ WT), (2) una versión optimizada por codón de C4 α -P2A- β (C4 $\alpha\beta$ CO) y (3) una variante del TCR con codones optimizados en la que C4 β , en lugar de C4 α , precede al elemento P2A (C4 $\beta\alpha$ CO). (A) Se detectó la expresión en superficie como una medición de la unión de tetrámeros de WT-1:HLA-A. (B) Se examinaron las diferencias en la

expresión de TCR entre los constructos C4 α -P2A- β CO y C4 β -P2A- α CO a lo largo del tiempo y se observó que eran más evidentes hacia el final del ciclo de células T, cuando se expresaron los TCR endógenos a mayores niveles. (C) Se muestra un dibujo esquemático de un constructo TCR $\beta\alpha$ de C4.

5 Las figuras 4A-4C muestran la detección y el análisis de una variante de afinidad potenciada del TCR C4 identificada mediante mutagénesis por saturación. (A) Se transdujeron PBMC para expresar o bien el constructo C4 α -P2A-C4 β de tipo natural o bien el constructo de afinidad potenciada C4 α -P2A-C4 β (DLT); se aislaron las células transducidas mediante clasificación celular, se expandieron y se analizaron para determinar la tinción relativa con tetrámeros de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ en células que expresan niveles equivalentes del TCR introducido (tal como se mide mediante tinción con V β 17). (B) Se tiñeron PBMC clasificadas que expresan o bien el constructo C4 α -P2A-C4 β de tipo natural o bien C4 α -P2A-C4 β (DLT) de afinidad potenciada con tetrámero de péptido de WT-1/CMH, se analizaron mediante citometría de flujo y se determinó la intensidad de fluorescencia media de la tinción con tetrámero usando el software FlowJo (Treestar). Se realizaron mediciones de K_D usando diluciones al 50% de tetrámeros conjugados con PE a un intervalo de concentraciones. Se determinaron los valores de K_D aparente a partir de las curvas de unión mediante regresión no lineal como la concentración de ligando que produjo una unión semimáxima. (C) Se incubaron PBMC clasificadas que expresan o bien el constructo C4 α -P2A-C4 β de tipo natural o bien C4 α -P2A-C4 β (DLT) de afinidad potenciada con células diana cargadas con ⁵¹Cr con pulsos de concentraciones decrecientes de péptido de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ tal como se indica, y se midió la destrucción específica mediada por células T como el porcentaje de liberación máxima de cromo.

20 La figura 5 muestra que las PBMC transducidas con el TCR de C4 $\alpha\beta$ (DLT) muestran una destrucción potenciada de células tumorales que presentan de manera natural el antígeno de WT-1. Se usaron las líneas de células tumorales K562 negativas para HLA-A2 o células K562 transducidas para expresar HLA-A2 como células diana para PBMC que expresan o bien el constructo C4 α -P2A-C4 β de tipo natural o bien el TCR de C4 α -P2A-C4 β (DLT) de afinidad potenciada. Se determinó la destrucción del tumor midiendo la caspasa-3 escindida en células tumorales mediante citometría de flujo.

30 Las figuras 6A-6C muestran los resultados de la generación y selección de bibliotecas de TCR β seleccionadas por agonistas humanas. Se purificaron HPC CD34⁺ a partir de sangre de cordón umbilical, se transdujeron de manera lentiviral con o bien C4 α -IRES-GFP o bien C4 $\alpha\beta$ y se cultivaron conjuntamente con la línea de células OP9-A2-DL1 en presencia de péptido de WT-1 1 μ g/ml. (A) Se analizaron los cultivos el día 31 para determinar la expresión de CD3 y CD27. (B) El día 34, se analizaron los cultivos para determinar la expresión de CD27 y V β 17, y se clasificaron aproximadamente 2,5 x 10⁵ células V β 17⁺CD27⁺ para la generación de bibliotecas de TCR β . (C) Se generaron bibliotecas de V β 17-C β 1 y V β 17-C β 2, se transdujeron en la línea de células H9.CD8-C4 α , seguido por la clasificación para células C4 α -GFP⁺ V β 17⁺ transducidas. Luego se clasificaron las células dos veces con tetrámero de WT-1 y se analizaron para determinar la tinción con tetrámero y V β 17 mediante citometría de flujo.

40 La figura 7 muestra la persistencia en 9 pacientes con leucemia de células T CD8 específicas de virus derivadas de los donantes transducidas para expresar el constructo de TCR de C4 $\beta\alpha$. Se estimularon las células T de los donantes con un péptido o bien de VEB o bien de CMV para activar específicamente una población de células T específicas de virus con un fenotipo de memoria central y para dirigir la transducción lentiviral preferentemente a estas células activadas y, por tanto, que se dividen rápidamente. Se transdujeron las células con el constructo de TCR de C4 $\beta\alpha$ y se clasificaron en células T con tinción positiva tanto para HLA-A2/WT-1 como para tetrámeros específicos de HLA-A2/péptido viral mediante clasificación celular por citometría de flujo. Se expandieron las células clasificadas y se infundieron en pacientes con leucemia en los puntos de tiempo indicados con una flecha en sentido descendente.

50 Las figuras 8A-8C muestran resultados que demuestran la estabilidad en la superficie celular de TCR específico de WT-1 funcional. (A) Se estimularon PBMC de donantes con células dendríticas (DC) que presentan péptido de VEB GLCTLVAML (SEQ ID NO.:127), transducidas con el constructo de TCR de C4 24 horas después, y se clasificaron en poblaciones WT_1 tetrámero⁺, VEB tetrámero⁺ o doble positivas el día 12 tal como se indica. (B) Se analizaron las poblaciones clasificadas inmediatamente después de la clasificación, o tras 12 días de cultivo *in vitro* adicional. (C) Se estimularon PBMC de donantes con DC que presentan péptido de VEB GLCTLVAML (SEQ ID NO.:127) y luego se clasificaron para células T VEB tetrámero⁺ después de 12 días de cultivo. Luego volvieron a reestimularse las células clasificadas con o sin transducción de TCR de C4 el día 1 después de la estimulación y se analizaron mediante citometría de flujo el día 6.

Descripción detallada

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona receptores de células T (TCR) que tienen alta afinidad por el antígeno peptídico de WT-1 asociado con un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (por ejemplo, antígeno leucocitario humano, HLA) para su uso en, por ejemplo, inmunoterapia adoptiva para tratar cáncer. Por medio de antecedentes, la mayoría de dianas tumorales para inmunoterapias basadas en células T son autoantígenos, ya que los tumores surgen a partir de tejido previamente normal. Por ejemplo, tales antígenos asociados a tumor (AAT) pueden expresarse a altos niveles en una célula cancerosa, pero no pueden expresarse o pueden expresarse mínimamente en otras células. Durante el desarrollo de células T en el timo, se permite que las células T que se unen

débilmente a autoantígenos sobrevivan en el timo, que pueden experimentar un desarrollo adicional para aumentar la especificidad contra invasores extraños, mientras que las células T que se unen fuertemente a autoantígenos se eliminan por el sistema inmunitario, ya que tales células aumentarían una respuesta autoinmunitaria no deseable. Así, las células T se clasifican por su capacidad relativa de unirse a antígenos para preparar el sistema inmunitario para responder contra un invasor extraño (es decir, reconocimiento de no autoantígeno) mientras que, al mismo tiempo, previenen una respuesta autoinmunitaria (es decir, reconocimiento de autoantígeno). Este mecanismo de tolerancia limita a las células T que se producen de manera natural que pueden reconocer (auto)antígenos tumorales con alta afinidad y, por tanto, elimina las células T que eliminarían eficazmente células tumorales. Por consiguiente, el aislamiento de células T que tienen TCR de alta afinidad específicos para antígenos tumorales es difícil porque tales células se eliminan esencialmente por el sistema inmunitario.

Una ventaja de la presente divulgación es que proporciona un TCR de alta afinidad o afinidad potenciada específico para un péptido de WT-1, en el que una célula que expresa un TCR de este tipo es capaz de unirse a un complejo de WT-1:HLA independientemente o en ausencia de CD8, es capaz de asociarse más eficazmente con una proteína CD3 en comparación con un TCR endógeno, o ambos. En determinados casos, un TCR de afinidad potenciada específico para un péptido de WT-1 comprende una cadena α de receptor de células T (TCR) tal como se expone en SEQ ID NO.:7 u 8 y un dominio variable de cadena β (V_β) de TCR tal como se expone en SEQ ID NO.:12 ó 13, en el que el TCR de afinidad potenciada es capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 3 nM, o en el que el TCR de afinidad potenciada se disocia de un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA a una tasa k_{off} reducida en comparación con un TCR que se compone de una cadena α de SEQ ID NO.:5 ó 6 y una cadena β de SEQ ID NO.:12 ó 13.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento tendrán, en determinados casos, utilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades y estados asociados con la sobreexpresión de WT-1 (por ejemplo, expresión de WT-1 detectable a un nivel que es mayor en magnitud, de manera estadísticamente significativa, que el nivel de expresión de WT-1 que es detectable en una célula normal o libre de enfermedad). Tales enfermedades incluyen diversas formas de trastornos hiperproliferativos, tales como neoplasias malignas hemáticas y cánceres sólidos. Los ejemplos no limitativos de estos y usos relacionados se describen en el presente documento, e incluyen estimulación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de respuestas específicas de antígeno WT-1 de células T, tales como mediante el uso de células T recombinantes que expresan un TCR de afinidad potenciada específico para un péptido de WT-1 (por ejemplo, RMFPNAPYL, SEQ ID NO.:16).

Antes de exponer esta divulgación con más detalle, puede ser útil para comprender la misma proporcionar definiciones de determinados términos que van a usarse en el presente documento. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de esta divulgación.

En la presente descripción, debe entenderse que cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de razones o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo enumerado y, cuando sea apropiado, fracciones del mismo (tal como la décima parte y la centésima parte de un número entero), a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que cualquier intervalo numérico enumerado en el presente documento en relación con cualquier característica física, tal como subunidades de polímero, tamaño o grosor, incluye cualquier número entero dentro del intervalo enumerado, a menos que se indique lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa $\pm 20\%$ del intervalo, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que los términos “un” y “una”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a “uno o más” de los componentes enumerados. Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) significa o bien uno, ambos o bien cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Tal como se usa en el presente documento, los términos “incluir”, “tener” y “comprender” se usan como sinónimos, cuyos términos y variantes de los mismos deben interpretarse como no limitativos.

Además, debe entenderse que los compuestos individuales, o grupos de compuestos, derivados de las diversas combinaciones de las estructuras y los sustituyentes descritos en el presente documento se divulgan por la presente solicitud en la misma medida que si cada compuesto o grupo de compuestos se expusiera individualmente.

El término “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o las etapas especificados, o a aquellos que no afectan de manera material a las características básicas de una invención reivindicada. Por ejemplo, un dominio, una región o un módulo de proteína (por ejemplo, un dominio de unión, región bisagra, módulo de ligador) o una proteína (que puede tener uno o más dominios, regiones o módulos) “consiste esencialmente en” una secuencia de aminoácidos particular cuando la secuencia de aminoácidos de un dominio, una región, un módulo o una proteína incluye extensiones, deleciones, mutaciones o una combinación de las mismas (por ejemplo, aminoácidos en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal o entre dominios) que, en combinación, contribuyen a, como máximo, el 20% (por ejemplo, como máximo, el 15%, el 10%, el 8%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1%) de la longitud de un dominio, una región, un módulo o una proteína y no afectan sustancialmente (es decir, no reducen la actividad en más del 50%, tal como no más del 40%, el 30%, el 25%, el 20%, el 15%, el 10%, el 5% o el 1%) a la actividad del/de los dominio(s), región/regiones, módulo(s) o proteína (por ejemplo, la afinidad de unión a diana de una proteína de unión).

Tal como se usa en el presente documento, una "célula del sistema inmunitario" significa cualquier célula del sistema inmunitario que se origina a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea, que da lugar a dos linajes principales, una célula progenitora mieloide (que da lugar a células mieloides tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos) y una célula progenitora linfóide (que da lugar a células linfoides tales como células T, células B y linfocitos citolíticos naturales (células NK)). Las células del sistema inmunitario a modo de ejemplo incluyen una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T doble negativa CD4⁻ CD8⁻, una célula T $\gamma\delta$, una célula T reguladora, un linfocito citolítico natural y una célula dendrítica. Los macrófagos y las células dendríticas pueden denominarse "células presentadoras de antígeno" o "APC", que son células especializadas que pueden activar las células T cuando un receptor del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie de la APC forma un complejo con un péptido que interacciona con un TCR en la superficie de una célula T.

"Complejo mayor de histocompatibilidad" (CMH) se refiere a glicoproteínas que administran antígenos peptídicos a una superficie celular. Las moléculas de CMH de clase I son heterodímeros que tienen una cadena α que atraviesa la membrana (con tres dominios α) y una microglobulina $\beta 2$ asociada de manera no covalente. Las moléculas de CMH de clase II se componen de dos glicoproteínas transmembrana, α y β , ambas de las cuales atraviesan la membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas de CMH de clase I administran péptidos que se originan en el citosol a la superficie celular, donde el complejo péptido:CMH se reconoce por células T CD8⁺. Las moléculas de CMH de clase II administran péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde se reconocen por células T CD4⁺. El CMH humano se denomina antígeno leucocitario humano (HLA).

Una "célula T" es una célula del sistema inmunitario que madura en el timo y produce receptores de células T (TCR). Las células T pueden ser indiferenciadas (no expuestas a antígeno; expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA y expresión disminuida de CD45RO en comparación con T_{CM}), células T de memoria (T_M) (experimentadas por antígeno y de vida larga) y células efectoras (experimentadas por antígeno, citotóxicas). Las T_M pueden dividirse adicionalmente en los subconjuntos de células T de memoria central (T_{CM}, expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95 y expresión disminuida de CD54RA en comparación con células T indiferenciadas) y células T de memoria efectora (T_{EM}, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con células T indiferenciadas o T_{CM}). Las células T efectoras (T_E) se refieren a linfocitos T citotóxicos CD8⁺ experimentados por antígeno que tienen expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28 y son positivos para granzima y perforina en comparación con T_{CM}. Otras células T a modo de ejemplo incluyen células T reguladoras, tales como células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) y células Treg17, así como células T restringidas por Tr1, Th3, CD8⁺CD28⁻ y Qa-1.

"Receptor de células T" (TCR) se refiere a un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (que tiene un dominio de unión variable, un dominio constante, una región transmembrana y una cola citoplásmica corta; véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3^a ed., Current Biology Publications, pág. 4:33, 1997) capaz de unirse específicamente a un péptido antigénico unido a un receptor de CMH. Un TCR puede encontrarse en la superficie de una célula o en forma soluble y generalmente se compone de un heterodímero que tiene cadenas α y β (también denominadas TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas γ y δ (también denominadas TCR γ y TCR δ , respectivamente). Como las inmunoglobulinas, la porción extracelular de las cadenas de TCR (por ejemplo, cadena α , cadena β) contiene dos dominios de inmunoglobulina, un dominio variable (por ejemplo, dominio variable de cadena α o V α , dominio variable de cadena β o V β ; normalmente los aminoácidos 1 a 116 basándose en la numeración de Kabat; Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, Dept. de Salud y Servicios Sociales estadounidense, Institutos Nacionales de Salud del Servicio de Salud Pública, 1991, 5^a ed.) en el extremo N-terminal y un dominio constante (por ejemplo, dominio constante de cadena α o C α , normalmente los aminoácidos 117 a 259 basándose en Kabat, dominio constante de cadena β o C β , normalmente los aminoácidos 117 a 295 basándose en Kabat) adyacente a la membrana celular. Además, como las inmunoglobulinas, los dominios variables contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) separadas por regiones de entramado (FR) (véanse, por ejemplo, Jores *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia *et al.*, EMBO J. 7:3745, 1988; véase también Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). En determinados casos, un TCR se encuentra en la superficie de células T (o linfocitos T) y se asocia con el complejo CD3. La fuente de un TCR, tal como se usa en la presente divulgación, puede ser de diversas especies de animales, tales como un humano, un ratón, una rata, un conejo u otro mamífero.

"CD3" se conoce en la técnica como un complejo multiproteico de seis cadenas (véanse, Abbas y Lichtman, 2003; Janeway *et al.*, pág. 172 y 178, 1999). En mamíferos, el complejo comprende una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ y un homodímero de cadenas CD3 ζ . Las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de superficie celular altamente relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un solo dominio de inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ están cargadas negativamente, que es una característica que permite que estas cadenas se asocien con las cadenas de receptores de células T cargadas positivamente. Cada una de las colas intracelulares de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen un solo motivo conservado conocido como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM, mientras que cada cadena CD3 ζ tiene tres. Sin desear estar unidos por la teoría, se cree que los ITAM son importantes para la capacidad de señalización de un complejo de TCR. CD3, tal como se usa en la presente divulgación, puede ser de diversas especies de animales, incluyendo humano, ratón, rata u otros mamíferos.

Tal como se usa en el presente documento, “complejo de TCR” se refiere a un complejo formado mediante la asociación de CD3 con TCR. Por ejemplo, un complejo de TCR puede componerse de una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ , un homodímero de cadenas CD3 ζ , una cadena TCR α y una cadena TCR β .
 5 Alternativamente, un complejo de TCR puede componerse de una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ , un homodímero de cadenas CD3 ζ , una cadena TCR γ y una cadena TCR δ .

Un “componente de un complejo de TCR”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de TCR (es decir, TCR α , TCR β , TCR γ o TCR δ), una cadena de CD3 (es decir, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ o CD3 ζ) o un complejo
 10 formado por dos o más cadenas de TCR o cadenas de CD3 (por ejemplo, un complejo de TCR α y TCR β , un complejo de TCR γ y TCR δ , un complejo de CD3 ϵ y CD3 δ , un complejo de CD3 γ y CD3 ϵ o un subcomplejo de TCR de TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ y dos cadenas CD3 ϵ).

Un “dominio de unión” (también denominado “región de unión” o “resto de unión”), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o porción de la misma (por ejemplo, péptido, oligopéptido, polipéptido, proteína) que posee la capacidad de asociarse, unirse o combinarse específicamente y de manera no covalente con una diana (por ejemplo, WT-1 o complejo péptido de WT-1:CMH). Un dominio de unión incluye cualquier pareja de unión que se produce de manera natural, sintética, semisintética o producida de manera recombinante para una molécula biológica, un complejo molecular (es decir, complejo que comprende dos o más moléculas biológicas) u otra diana de interés.
 15 Los dominios de unión a modo de ejemplo incluyen regiones variables de inmunoglobulina de cadena sencilla (por ejemplo, scTCR, scFv), ectodominios de receptor, ligandos (por ejemplo, citocinas, quimiocinas) o polipéptidos sintéticos seleccionados por su capacidad específica de unirse a una molécula biológica, un complejo molecular u otra diana de interés.

Tal como se usa en el presente documento, “se une específicamente” o “específico para” se refiere a una asociación o unión de una proteína de unión (por ejemplo, receptor TCR) o un dominio de unión (o proteína de fusión del mismo) a una molécula diana con una afinidad o K_a (es decir, una constante de asociación en equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/M) igual a o mayor de 10^5 M^{-1} (que equivale a la razón de la tasa de asociación [k_{on}] con respecto a la tasa de disociación [k_{off}] para esta reacción de asociación), mientras que no se asocia ni una significativamente con ninguna otra molécula u otro componente en una muestra. Las proteínas de unión o los dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) pueden clasificarse como proteínas de unión o dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) de “alta afinidad” o como proteínas de unión o dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) de “baja afinidad”. Las proteínas de unión o los dominios de unión de “alta afinidad” se refieren a aquellas proteínas de unión o aquellos dominios de unión que tienen una K_a de al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} , al menos 10^{12} M^{-1} o al menos 10^{13} M^{-1} . Las proteínas de unión o los dominios de unión de “baja afinidad” se refieren a aquellas proteínas de unión o aquellos dominios de unión que tienen una K_a de hasta 10^7 M^{-1} , hasta 10^6 M^{-1} , hasta 10^5 M^{-1} . Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación en equilibrio (K_d) de un interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo, de 10^{-5} M a 10^{-13} M).
 25
 30
 35

En determinados casos, un receptor o dominio de unión puede tener “afinidad potenciada”, que se refiere a receptores o dominios de unión seleccionados o modificados por ingeniería genética con una unión más fuerte a un antígeno diana que un dominio de unión de tipo natural (o parental). Por ejemplo, la afinidad potenciada puede deberse a una K_a (constante de asociación en equilibrio) para el antígeno diana que es mayor que la del dominio de unión de tipo natural, deberse a una K_d (constante de disociación) para el antígeno diana que es menor que la del dominio de unión de tipo natural, deberse a una tasa de disociación (k_{off}) para el antígeno diana que es menor que la del dominio de unión de tipo natural, o una combinación de los mismos. En determinados casos, los TCR de afinidad potenciada pueden estar con codones optimizados para potenciar la expresión en una célula huésped particular, tal como células T (Scholten *et al.*, Clin. Immunol. 119:135, 2006).
 40
 45

Se conocen una variedad de ensayos para identificar dominios de unión de la presente divulgación que se unen específicamente a una diana particular, así como determinar afinidades de dominios de unión o proteínas de fusión, tales como inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore®) (véanse, por ejemplo, Scatchard *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff *et al.*, Cancer Res. 53:2560, 1993; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.283.173, 5.468.614 o equivalentes).
 50
 55

El término “proteína de unión específica de WT-1” se refiere a una proteína o un polipéptido que se une específicamente a WT-1 o un péptido de la misma. En algunos casos, una proteína o un polipéptido se une a WT-1 o un péptido de la misma, tal como un péptido de WT-1 en forma de complejo con una molécula de CMH o HLA, por ejemplo, en una superficie celular, con al menos aproximadamente una afinidad particular. En determinados casos, una proteína de unión específica de WT-1 se une a un complejo péptido derivado de WT-1:HLA (o complejo péptido derivado de WT-1:CMH) con una K_d menor de aproximadamente 10^{-8} M , menor de aproximadamente 10^{-9} M , menor de aproximadamente 10^{-10} M , menor de aproximadamente 10^{-11} M , menor de aproximadamente 10^{-12} M o menor de aproximadamente 10^{-13} M , o con una afinidad que es aproximadamente la misma que, al menos aproximadamente la
 60
 65

misma que o mayor que aproximadamente la afinidad mostrada por una proteína de unión específica de WT-1 a modo de ejemplo proporcionada en el presente documento, tal como cualquiera de los TCR de específicos WT-1 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, tal como se mide mediante el mismo ensayo. Se conocen ensayos para evaluar la afinidad o afinidad aparente o afinidad relativa. En determinados ejemplos, la afinidad aparente por un TCR se mide evaluando la unión a diversas concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando tetrámeros marcados. En algunos ejemplos, la K_D aparente de un TCR se mide mediante el uso de diluciones al 50% de tetrámeros marcados a un intervalo de concentraciones, seguido por la determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, determinándose la K_D aparente como la concentración de ligando que produjo una unión semimáxima. En determinados casos, una proteína de unión específica de WT-1 comprende una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas específica de WT-1 o una porción de unión de la misma.

El término “dominio de unión de WT-1” o “fragmento de unión de WT-1” se refiere a un dominio o una porción de una proteína de unión específica de WT-1 responsable de la unión a WT-1 específica. Un dominio de unión específico de WT-1 solo (es decir, sin ninguna otra porción de una proteína de unión específica de WT-1) puede ser soluble y puede unirse a WT-1 con una K_d menor de aproximadamente 10^{-8} M, menor de aproximadamente 10^{-9} M, menor de aproximadamente 10^{-10} M, menor de aproximadamente 10^{-11} M, menor de aproximadamente 10^{-12} M o menor de aproximadamente 10^{-13} M. Los dominios de unión específicos de WT-1 a modo de ejemplo incluyen scTCR específico de WT-1 (por ejemplo, proteínas $\alpha\beta$ TCR de cadena sencilla tales como V_α -L- V_β , V_β -L- V_α , V_α -C α -L- V_α o V_α -L- V_β -C β , en las que V_α y V_β son dominios variables de TCR α y β respectivamente, C α y C β son dominios constantes de TCR α y β , respectivamente, y L es un ligador) y fragmentos scFv, tal como se describen en el presente documento, que pueden derivarse de un anticuerpo o TCR anti-WT-1.

“Antígeno WT-1” o “antígeno peptídico de WT-1” se refiere a una porción producida de manera natural o sintética de una proteína WT-1 que oscila en longitud desde aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 15 aminoácidos, que puede formar un complejo con una molécula de CMH (por ejemplo, HLA), y un complejo de este tipo puede unirse con un TCR específico para un complejo péptido de WT-1:CMH (por ejemplo, HLA). Los principios de procesamiento de antígenos mediante células presentadoras de antígeno (APC) (tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos u otros tipos de células) y de presentación de antígenos mediante APC a células T, incluyendo la presentación restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) entre APC y células T inmunocompatibles (por ejemplo, que comparten al menos una forma alélica de un gen de CMH que es relevante para la presentación de antígenos) están bien establecidos (véase, por ejemplo, Murphy, Janeway's Immunobiology (8ª ed.) 2011 Garland Science, NY; capítulos 6, 9 y 16). Por ejemplo, los péptidos antigénicos procesados que se originan en el citosol (por ejemplo, antígeno tumoral, patógeno intracelular) son generalmente de desde aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 11 aminoácidos de longitud y se asociarán con moléculas de CMH de clase I, mientras que los péptidos procesados en el sistema vesicular (por ejemplo, bacterianos, virales) variarán en longitud desde aproximadamente 10 aminoácidos hasta aproximadamente 25 aminoácidos y se asociarán con moléculas de CMH de clase II. Dado que WT-1 es una proteína huésped interna, los péptidos antigénicos de WT-1 se presentarán en el contexto de CMH de clase I. En casos particulares, un péptido de WT-1 es RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16), que se sabe que se asocia con HLA de clase I humano (y, más específicamente, se asocia con el alelo HLA-A*201).

Un “ligador” se refiere a una secuencia de aminoácidos que conecta dos proteínas, polipéptidos, péptidos, dominios, regiones o motivos y que puede proporcionar una función espaciadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión, de modo que el polipéptido resultante conserva una afinidad de unión específica (por ejemplo, scTCR) con una molécula diana o conserva la actividad de señalización (por ejemplo, complejo de TCR). En determinados casos, un ligador se compone de aproximadamente dos a aproximadamente 35 aminoácidos, por ejemplo, o de aproximadamente cuatro a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente ocho a aproximadamente 15 aminoácidos, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos.

“Aminoácidos de unión” o “residuos de aminoácido de unión” se refiere a uno o más (por ejemplo, aproximadamente 2-10) residuos de aminoácido entre dos motivos, regiones o dominios adyacentes de un polipéptido, tal como entre un dominio de unión y un dominio constante adyacente o entre una cadena de TCR y un péptido autoescindible adyacente. Los aminoácidos de unión pueden resultar del diseño de constructos de una proteína de fusión (por ejemplo, residuos de aminoácido que resultan del uso de un sitio de enzima de restricción durante la construcción de una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión).

Un “dominio alterado” o “proteína alterada” se refiere a un motivo, una región, un dominio, un péptido, un polipéptido o una proteína con una identidad de secuencia no idéntica con respecto a un motivo, una región, un dominio, un péptido, un polipéptido o una proteína de tipo natural (por ejemplo, una cadena TCR α , una cadena TCR β , un dominio constante de TCR α , un dominio constante de TCR β de tipo natural) de al menos el 85% (por ejemplo, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99,1%, el 99,2%, el 99,3%, el 99,4%, el 99,5%, el 99,6%, el 99,7%, el 99,8%, el 99,9%).

Tal como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquiera de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante traducción *in vitro*, y fragmentos generados mediante

cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasas o acción de exonucleasas. En determinados casos, los ácidos nucleicos de la presente divulgación se producen mediante PCR. Los ácidos nucleicos pueden componerse de monómeros que son nucleótidos que se producen de manera natural (tales como desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos), análogos de nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen de manera natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones en o reemplazo de restos de azúcares o restos de base de pirimidina o purina. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser o bien monocatenarias o bien bicatenarias.

El término “aislado” significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es que se produce de manera natural). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que se produce de manera natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo ácido nucleico o polipéptido, separado de algunos o todos de los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tal ácido nucleico podría formar parte de un vector y/o tal ácido nucleico o polipéptido podría formar parte de una composición (por ejemplo, un lisado celular) y todavía estar aislado en tal vector o composición que no forma parte del entorno natural para el ácido nucleico o polipéptido. El término “gen” significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante “líder y trasera” así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

Tal como se usa en el presente documento, el término “recombinante” se refiere a una célula, un microorganismo, una molécula de ácido nucleico o un vector que se ha modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico exógena, o se refiere a una célula o un microorganismo que se ha alterado de tal manera que la expresión de una molécula de ácido nucleico o un gen endógenos está controlada, desregulada o es constitutiva, en los que tales alteraciones o modificaciones pueden introducirse mediante ingeniería genética. Las alteraciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, modificaciones que introducen moléculas de ácido nucleico (que pueden incluir un elemento de control de la expresión, tal como un promotor) que codifican para una o más proteínas o enzimas, u otras adiciones, deleciones, sustituciones u otra perturbación funcional de moléculas de ácido nucleico de o además del material genético de una célula. Las modificaciones a modo de ejemplo incluyen aquellas en regiones codificantes o fragmentos funcionales de las mismas de polipéptidos heterólogos u homólogos de una molécula de referencia o parental.

Tal como se usa en el presente documento, “mutación” se refiere a un cambio en la secuencia de una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido en comparación con una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido de referencia o de tipo natural, respectivamente. Una mutación puede dar como resultado varios tipos diferentes de cambios en la secuencia, incluyendo sustitución, inserción o delección de nucleótido(s) o aminoácido(s). En determinados casos, una mutación es una sustitución de uno o tres codones o aminoácidos, una delección de uno a aproximadamente 5 codones o aminoácidos, o una combinación de los mismos.

Una “sustitución conservadora” se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. En la técnica se conocen bien sustituciones conservadoras a modo de ejemplo (véanse, por ejemplo, la página 10 del documento WO 97/09433; Lehninger, Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc. NY, NY, págs. 71-77, 1975; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY y Cell Press, Cambridge, MA, pág. 8, 1990).

El término “constructo” se refiere a cualquier polinucleótido que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante. Un constructo puede estar presente en un vector (por ejemplo, un vector bacteriano, un vector viral) o puede integrarse en el genoma. Un “vector” es una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico. Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede incluir moléculas de ácido nucleico cromosómicas, no cromosómicas, semisintéticas o sintéticas. Los vectores a modo de ejemplo son aquellos capaces de la replicación autónoma (vector episómico) o la expresión de moléculas de ácido nucleico a las que se unen (vectores de expresión).

Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN bicatenario incluyendo adenovirus, virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple de tipo 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, *Vaccinia*, viruela aviar y viruela de los canarios). Otros virus incluyen, por ejemplo, virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis. Los ejemplos de retrovirus incluyen leucosis-sarcoma aviar, virus de tipo C, de tipo B, de tipo D de mamífero, grupo de VLTH-VLB, lentivirus, spumavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, en Fundamental Virology, tercera edición, B. N. Campos *et al.*, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996).

“Vector lentiviral”, tal como se usa en el presente documento, significa vectores lentivirales basados en VIH para la

administración génica, que pueden ser integradores o no integradores, tener una capacidad de empaquetamiento relativamente grande y pueden transducir una gama de tipos de células diferentes. Los vector lentivirales se generan habitualmente tras la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltura y transferencia) o más plásmidos en células productoras. Como el VIH, los vectores lentivirales entran en la célula diana a través de la interacción de glicoproteínas de superficie virales con receptores en la superficie celular. En la entrada, el ARN viral experimenta transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa viral. El producto de transcripción inversa es un ADN viral lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de células infectadas.

El término “unido operativamente” se refiere a la asociación de dos o más moléculas de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico, de modo que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). “No unido” significa que los elementos genéticos asociados no están estrechamente asociados entre sí y la función de uno no afecta al otro.

Tal como se usa en el presente documento, “vector de expresión” se refiere a un constructo de ADN que contiene una molécula de ácido nucleico que está unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de la molécula de ácido nucleico en un huésped adecuado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica para sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, un virus o simplemente un inserto genómico a potencial. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede integrarse, en algunos casos, en el propio genoma. En la presente memoria descriptiva, “plásmido”, “plásmido de expresión”, “virus” y “vector” se usan a menudo de manera intercambiable.

El término “expresión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia codificante de una molécula de ácido nucleico, tal como un gen. El proceso puede incluir transcripción, control postranscripcional, modificación postranscripcional, traducción, control postraduccion, modificación postraduccion o cualquier combinación de los mismos.

El término “introducido” en el contexto de insertar una molécula de ácido nucleico en una célula, significa “transfección” o “transformación” o “transducción”, e incluye la referencia a la incorporación de una molécula de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota, en la que la molécula de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de una célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado).

Tal como se usa en el presente documento, molécula de ácido nucleico, constructo o secuencia “heterólogos” o “exógenos” se refiere a una molécula de ácido nucleico o porción de una molécula de ácido nucleico que no es nativa de una célula huésped, pero puede ser homóloga a una molécula de ácido nucleico o porción de una molécula de ácido nucleico de la célula huésped. La fuente de la molécula de ácido nucleico, el constructo o la secuencia heterólogos o exógenos puede ser de un género o una especie diferentes. En determinados casos, una molécula de ácido nucleico heteróloga o exógena se añade (es decir, no endógena ni nativa) a una célula huésped o un genoma huésped mediante, por ejemplo, conjugación, transformación, transfección, electroporación o similares, en la que la molécula añadida puede integrarse en el genoma del huésped o existir como material genético extracromosómico (por ejemplo, como un plásmido u otra forma de vector autorreplicante), y puede estar presente en múltiples copias. Además, “heteróloga” se refiere a una enzima, una proteína u otra actividad no nativa codificada por una molécula de ácido nucleico exógena introducida en la célula huésped, incluso si la célula huésped codifica para una proteína o actividad homóloga.

Tal como se describe en el presente documento, puede introducirse más de una molécula de ácido nucleico heteróloga o exógena en una célula huésped como moléculas de ácido nucleico independientes, como una pluralidad de genes controlados individualmente, como una molécula de ácido nucleico policistrónica, como una sola molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, tal como se divulga en el presente documento, una célula huésped puede modificarse para expresar dos o más moléculas de ácido nucleico heterólogas o exógenas que codifican para un TCR deseado específico para un péptido antigénico de WT-1 (por ejemplo, TCR α y TCR β). Cuando se introducen dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas en una célula huésped, se entiende que las dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas pueden introducirse como una sola molécula de ácido nucleico (por ejemplo, en un único vector), en vectores independientes, integrarse en el cromosoma del huésped en un solo sitio o en múltiples sitios, o cualquier combinación de los mismos. El número de moléculas de ácido nucleico o actividades de proteína heterólogas referenciadas se refiere al número de moléculas de ácido nucleico codificantes o al número de actividades de proteína, no al número de moléculas de ácido nucleico independientes introducidas en una célula huésped.

Tal como se usa en el presente documento, el término “endógeno” o “nativo” se refiere a un gen, una proteína o una actividad que está normalmente presente en una célula huésped. Además, un gen, una proteína o una actividad que

están mutados, sobreexpresados, permutados al azar, duplicados o alterados de otro modo en comparación con un gen, una proteína o una actividad parentales todavía se considera que son endógenos o nativos de esa célula huésped particular. Por ejemplo, una secuencia de control endógena de un primer gen (por ejemplo, secuencias de atenuación traduccional promotoras) puede usarse para alterar o regular la expresión de un segundo gen o una segunda molécula de ácido nucleico nativos, en la que la expresión o regulación del segundo gen o la segunda molécula de ácido nucleico nativos difiera de la expresión o regulación normal en una célula parental.

El término "homólogo" se refiere a una molécula o actividad encontrada en o derivada de una célula huésped, especie o cepa. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico heteróloga o exógena puede ser homóloga de un gen de célula huésped nativo, y puede tener opcionalmente un nivel de expresión alterado, una secuencia diferente, una actividad alterada, o cualquier combinación de los mismos.

"Identidad de secuencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia que son idénticos con los residuos de aminoácido en otra secuencia de polipéptido de referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los valores de porcentaje de identidad de secuencia pueden generarse usando el software BLAST2.0 de NCBI tal como se define por Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, con los parámetros ajustados a los valores por defecto.

Tal como se usa en el presente documento, una "célula progenitora hematopoyética" es una célula que puede derivarse de células madre hematopoyéticas o tejido fetal y que es capaz de diferenciarse adicionalmente en tipos de células maduras (por ejemplo, células del sistema inmunitario). Las células progenitoras hematopoyéticas a modo de ejemplo incluyen aquellas con un fenotipo CD24^{Lo} Lin⁻ CD117⁺ o aquellas encontradas en el timo (denominadas timocitos progenitores).

Tal como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a una célula (por ejemplo, célula T) o un microorganismo seleccionado como diana para la modificación genética con una molécula de ácido nucleico heteróloga o exógena para producir un polipéptido de interés (por ejemplo, TCR anti-WT-1 de alta afinidad o afinidad potenciada). En determinados casos, una célula huésped ya puede poseer o estar modificada opcionalmente para incluir otras modificaciones genéticas que otorgan propiedades deseadas relacionadas o no relacionadas con la biosíntesis de la proteína heteróloga o exógena (por ejemplo, inclusión de un marcador detectable; TCR endógeno deletado, alterado o truncado; expresión aumentada de factor coestimulador). En determinados casos, una célula huésped es una célula progenitora hematopoyética humana transducida con una molécula de ácido nucleico heteróloga o exógena que codifica para una cadena TCR α específica para un péptido antigénico de WT-1.

Tal como se usa en el presente documento, "trastorno hiperproliferativo" se refiere al exceso de crecimiento o proliferación en comparación con una célula normal o no enferma. Los trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores, cánceres, tejido neoplásico, carcinoma, sarcoma, células malignas, células premalignas, así como trastornos hiperproliferativos no neoplásicos o no malignos (por ejemplo, adenoma, fibroma, lipoma, leiomioma, hemangioma, fibrosis, reestenosis, así como enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal o similares).

Proteínas de unión específicas para péptidos antigénicos de WT-1

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una proteína de unión (por ejemplo, una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o porción de la misma), que comprende (a) un dominio de cadena variable α (V_α) de receptor de células T (TCR) que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en SEQ ID NO.:23, una secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en SEQ ID NO.:24 y una secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO.:25, 26, 32, 38, 44, 50 y 51, y un dominio variable de cadena β (V_β) de TCR; o (b) un dominio V_α de (a) y un dominio V_β que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en SEQ ID NO.:27, una secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en SEQ ID NO.:28 y una secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en SEQ ID NO.:29. Una proteína de unión de este tipo es capaz de unirse con una alta afinidad a un complejo péptido derivado de WT-1:antígeno leucocitario humano (HLA). En casos particulares, la proteína de unión se une a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):antígeno leucocitario humano (HLA) con una K_d menor de o igual a aproximadamente 8 nM.

En determinados casos, una proteína de unión (por ejemplo, una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o porción de la misma) o un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad específicos para WT-1, tal como se describe en el presente documento, incluye especies de polipéptidos variantes que tienen una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos en relación con las secuencias de las SEQ ID NO.:1-15, 21 y 22, tal como se presenta en el presente documento, siempre que la proteína de unión conserve o conserve sustancialmente su función de unión específica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se conocen bien, y pueden producirse de manera natural o pueden introducirse cuando la proteína de unión o el TCR se produce de manera recombinante. Las sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos pueden introducirse en una proteína usando métodos de mutagénesis conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook

et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001). Pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específicos de sitio (o específicos de segmento) dirigidos por oligonucleótidos para proporcionar un polinucleótido alterado que tiene codones particulares alterados según la sustitución, delección o inserción deseada. Alternativamente, pueden usarse técnicas de mutagénesis al azar o por saturación, tales como mutagénesis de exploración con alanina, mutagénesis de reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores y mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para preparar variantes de polipéptidos inmunógenos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente).

La especie (o variantes) de una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad específico para WT-1 particulares pueden incluir una proteína que tiene al menos el 85%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo divulgadas en el presente documento (por ejemplo, las SEQ ID NO.:1-15, 21 y 22), siempre que (a) al menos tres o cuatro de las CDR no tengan mutaciones, (b) las CDR que sí tienen mutaciones sólo tengan hasta dos sustituciones de aminoácidos, hasta una delección de cinco aminoácidos contiguos o una combinación de las mismas y (c) la proteína de unión conserve su capacidad de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 8 nM.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas, que comprende (a) un dominio variable de cadena α (V_α) de receptor de células T (TCR) que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2 y un dominio variable de cadena β (V_β) de TCR; o (b) un dominio V_α y un dominio V_β que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9; o (c) un dominio V_α de (a) y un dominio V_β de (b); en la que la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM. En determinados casos, el dominio V_α comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, el dominio V_β comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9, o una combinación de los mismos.

En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad, que comprende una cadena α y una cadena β , en el que la cadena α comprende un dominio V_α que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, en el que el TCR se une a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 en una superficie celular independientemente o en ausencia de CD8. En determinados casos, el dominio V_α comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, el dominio V_β comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9, o una combinación de los mismos. En determinados casos, una cadena V_β es un alelo $V_{\beta 17}$.

Una variedad de criterios conocidos por los expertos en la técnica indican si un aminoácido que está sustituido en una posición particular en un péptido o polipéptido es conservadora (o similar). Por ejemplo, un aminoácido similar o una sustitución conservadora de aminoácido es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Los aminoácidos similares pueden incluirse en las siguientes categorías: aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); aminoácidos con cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); aminoácidos con cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). La prolina, que se considera más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, leucina, valina, isoleucina y alanina). En determinadas circunstancias, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico puede considerarse una sustitución similar en que la glutamina y la asparagina son derivados amídicos de ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente. Tal como se entiende en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácidos conservados de la misma del polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido (por ejemplo, usando GENEWORKS, Align, el algoritmo BLAST u otros algoritmos descritos en el presente documento y practicados en la técnica).

En determinados casos, una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 comprende un dominio V_α que es al menos aproximadamente el 90% idéntico a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:21 ó 22 y comprende un dominio V_β que es al menos aproximadamente el 90% idéntico a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9, siempre que (a) al menos tres o cuatro de las CDR no tengan mutaciones y (b) las CDR que sí tienen mutaciones sólo tengan hasta dos sustituciones de aminoácidos, una delección de hasta cinco aminoácidos contiguos o una combinación de las mismas. En casos adicionales, una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 comprende un dominio V_α que es al menos aproximadamente el 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2 y comprende un dominio V_β que es al menos aproximadamente el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9, siempre que

la proteína de unión sea capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM.

5 En cualquiera de los casos mencionados anteriormente, una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 es capaz de (a) unirse específicamente a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA en una superficie celular independientemente o en ausencia de CD8, (b) unirse específicamente a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201, (c) unirse al complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 con una K_d menor de o igual a aproximadamente 3 nM o (d) cualquier combinación de los mismos.

10 En determinados casos, el dominio V_α de una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2. En otros casos, el dominio V_β comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9.

15 En todavía casos adicionales, una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 comprende un dominio constante de cadena α que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:3 ó 4, comprende un dominio constante de cadena β que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:10 u 11 o cualquier combinación de los mismos. En determinados casos, una cadena V_β es un alelo V_β 17.

20 En determinados casos, una proteína de unión específica de WT-1 es un receptor de células T (TCR), un receptor de antígeno quimérico o un fragmento de unión a antígeno de un TCR, pudiendo ser cualquiera de los cuales quimérico, humanizado o humano. En casos adicionales, un fragmento de unión a antígeno del TCR comprende un TCR de cadena sencilla (scTCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En determinados casos, una proteína de unión específica de WT-1 es un TCR. En casos relacionados, una proteína de unión específica de WT-1 (a) comprende una
25 cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO.:5-8 y comprende una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12 ó 13; (b) tiene una cadena α de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:5 y la cadena β de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12; (c) tiene una cadena α de TCR que comprende o consiste en una secuencia de
30 aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:7 y la cadena β de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12; (d) tiene una cadena α de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:6 y la cadena β de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:13; o (e) tiene una cadena α de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:8 y la cadena β de TCR
35 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:13.

En determinados casos, se proporciona una composición que comprende una proteína de unión específica de WT o un TCR recombinante de alta afinidad según uno cualquiera de los casos mencionados anteriormente y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Los métodos útiles para aislar y purificar TCR soluble producido de manera recombinante, a modo de ejemplo, pueden incluir obtención de sobrenadantes a partir de sistemas de célula huésped/vector adecuados que secretan el TCR soluble recombinante en medios de cultivo y luego concentración de los medios usando un filtro disponible comercialmente. Tras la concentración, el concentrado puede aplicarse a una sola matriz de purificación adecuada o
45 a una serie de matrices adecuadas, tales como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Pueden emplearse una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante. Estos métodos de purificación también pueden emplearse cuando se aísla un inmunógeno a partir de su entorno natural. Los métodos para la producción a gran escala de uno o más de los TCR solubles aislados/recombinantes descritos en el presente documento incluyen cultivo celular discontinuo, que se monitoriza y controla para mantener
50 unas condiciones de cultivo apropiadas. La purificación del TCR soluble puede realizarse según los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica y que se ajustan a las leyes y directrices de las agencias reguladoras nacionales e internacionales.

En determinados casos, se usan moléculas de ácido nucleico que codifican para una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o un TCR de afinidad potenciada específicos para WT-1 para transfectar/transducir una célula huésped (por ejemplo, células T) para su uso en terapia de transferencia adoptiva. Se han descrito avances en la secuenciación de TCR (por ejemplo, Robins *et al.*, 2009 Blood 114:4099; Robins *et al.*, 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64, PMID: 20811043; Robins *et al.* 2011 (Sept. 10) J. Imm. Met. Publicación electrónica previa a la impresión, PMID: 21945395; Warren *et al.*, 2011 Genome Res. 21:790) y pueden emplearse en el transcurso de la práctica de
60 los aspectos según la presente divulgación. De manera similar, se han descrito métodos para transfectar/transducir células T con ácidos nucleicos deseados (por ejemplo, el documento US 2004/0087025) al igual que procedimientos de transferencia adoptiva usando células T de especificidad de antígeno deseada (por ejemplo, Schmitt *et al.*, Hum. Gen. 20:1240, 2009; Dossett *et al.*, Mol. Ther. 17:742, 2009; Till *et al.*, Blood 112:2261, 2008; Wang *et al.*, Hum. Gene Ther. 18:712, 2007; Kuball *et al.*, Blood 109:2331, 2007; el documento US 2011/0243972; el documento
65 US2011/0189141; Leen *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007), de tal manera que se contempla la adaptación de

estas metodologías a los aspectos divulgados en el presente documento, basándose en las enseñanzas en el presente documento, incluyendo aquellas dirigidas a TCR de afinidad potenciada específicos para antígeno peptídico de WT-1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16) que forma un complejo con un receptor de HLA.

- 5 Las proteínas o los dominios de unión específicos de WT-1, tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, las SEQ ID NO:1-15 y 21-31 y variantes de las mismas), pueden caracterizarse funcionalmente según cualquiera de un gran número de metodologías aceptadas en la técnica para someter a ensayo la actividad de células T, incluyendo la determinación de la unión, activación o inducción de células T, y también incluyendo la determinación de respuestas de células T que son específicas de antígeno. Los ejemplos incluyen la determinación de la proliferación de células T, la liberación de citocinas de células T, la estimulación de células T específicas de antígeno, la estimulación de células T restringidas por CMH, la actividad de CTL (por ejemplo, mediante la detección de la liberación de ^{51}Cr a partir de células diana cargadas previamente), cambios en la expresión de marcadores fenotípicos de células T y otras mediciones de funciones de células T. Los procedimientos para realizar estos ensayos y ensayos similares pueden encontrarse, por ejemplo, en Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998). Véanse también Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell y Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green y Reed, Science 281:1309 (1998) y las referencias citadas en los mismos).
- 10 “Tinción con tetrámero de CMH-péptido” se refiere a un ensayo usado para detectar células T específicas de antígeno, que presenta un tetrámero de moléculas de CMH, comprendiendo cada una un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es relacionada (por ejemplo, idéntica o relacionada con) de al menos un antígeno (por ejemplo, WT-1), en el que el complejo es capaz de unirse a receptores de células T específicos para el antígeno relacionado. Cada una de las moléculas de CMH puede etiquetarse con una molécula de biotina. Los CMH/péptidos biotinilados se tetramerizan mediante la adición de estreptavidina, que pueden marcarse de manera fluorescente. El tetrámero puede detectarse mediante citometría de flujo a través de un marcador fluorescente. En determinados casos, un ensayo de tetrámero de CMH-péptido se usa para detectar o seleccionar TCR de afinidad potenciada de la presente divulgación.
- 15 Los niveles de citocinas pueden determinarse según los métodos descritos en el presente documento y practicarse en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, ELISPOT, tinción intracelular de citocinas y citometría de flujo, y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción intracelular de citocinas y citometría de flujo). La proliferación de células inmunitarias y la expansión clonal que resultan de una provocación o estimulación específica de antígeno de una respuesta inmunitaria pueden determinarse mediante el aislamiento de linfocitos, tales como linfocitos circulantes en muestras de células de sangre periférica o células de los ganglios linfáticos, la estimulación de las células con antígeno y la medición de la producción de citocinas, la proliferación celular y/o la viabilidad celular, tal como mediante la incorporación de timidina tritiada o ensayos no radiactivos, tales como ensayos con MTT y similares. El efecto de un inmunógeno descrito en el presente documento sobre el equilibrio entre una respuesta inmunitaria Th1 y una respuesta inmunitaria Th2 puede examinarse, por ejemplo, mediante la determinación de los niveles de citocinas Th1, tales como IFN- γ , IL-12, IL-2 y TNF- β , y citocinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

Polinucleótidos que codifican para proteínas de unión específicas para péptidos antigénicos de WT-1

- 45 Pueden producirse y prepararse moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican para una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad específicos para WT-1, tal como se describen en el presente documento, según diversos métodos y técnicas de las técnicas de biología molecular o purificación de polipéptidos. La construcción de un vector de expresión que se usa para producir de manera recombinante una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o un TCR recombinante de alta afinidad específicos para WT-1 de interés puede lograrse usando cualquier técnica de modificación por ingeniería genética de biología molecular adecuada conocida en la técnica, incluyendo el uso de digestión con endonucleasas de restricción, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo, tal como se describe en Sambrook *et al.* (ediciones de 1989 y 2001; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology (2003)). Para obtener una transcripción y una traducción eficientes, un polinucleótido en cada constructo de expresión recombinante incluye al menos una secuencia de control de la expresión apropiada (también denominada secuencia reguladora), tal como una secuencia líder y, particularmente, un promotor unido de manera operable (es decir, operativamente) a la secuencia de nucleótidos que codifica para el inmunógeno. En determinados casos, un polinucleótido que tiene codones optimizados para la expresión eficiente en una célula huésped diana.
- 50
- 55
- 60 Determinados aspectos se refieren a ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos contemplados en el presente documento, por ejemplo, proteínas de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o TCR recombinantes de alta afinidad específicos para WT-1. Tal como reconocerá un experto en la técnica, un ácido nucleico puede hacer referencia a ADN, ADNc o ARN monocatenarios o bicatenarios en cualquier forma, y puede incluir una cadena positiva y una negativa del ácido nucleico con el que se complementa, incluyendo ADN, ADNc y ARN antisentido. También se incluyen ARNip, microARN, híbridos de ARN-ADN, ribozimas y otras diversas formas que se producen de manera natural o sintéticas de ADN o ARN.
- 65

Pueden usarse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante, péptidos y oligonucleótidos, inmunoensayos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se logra comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Estas técnicas y procedimientos y relacionados pueden realizarse generalmente según métodos convencional bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas en técnicas de microbiología, biología molecular, bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología que se citan y comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véanse, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley y Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford Univ. Press EE.UU., 1985); *Current Protocols in Immunology* (editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Etan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, editado por Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, RU; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes* (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, Nueva York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3ª edición, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walquer, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6ª edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Kurstad Turksen, Ed., 2002); *Embryonic Stem Cell Protocols: Volumen I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology)* (Kurstad Turksen, Ed., 2006); *Embryonic Stem Cell Protocols: Volumen II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology)* (Kurstad Turksen, Ed., 2006); *Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Kursad Turksen Ed., 2006); *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney y Bruce A. Bunnell Eds., 2008); *Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine)* (Christopher A. Klug, y Craig T. Jordan Eds., 2001); *Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Kevin D. Bunting Ed., 2008) *Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Leslie P. Weiner Ed., 2008).

Determinados aspectos incluyen ácidos nucleicos contenidos en un vector. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente vectores adecuados para su uso con determinados aspectos divulgados en el presente documento. Un vector típico puede comprender una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido, o que es capaz de replicarse en un organismo huésped. Algunos ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, cósmidos y otros. Algunos vectores pueden ser capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos), mientras que otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y replicarse de ese modo junto con el genoma huésped. Además, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente (estos vectores pueden denominarse "vectores de expresión"). Según aspectos relacionados, se entiende además que, si uno o más agentes (por ejemplo, polinucleótidos que codifican para proteínas de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o TCR recombinantes de alta afinidad específicos para WT-1 o variantes de los mismos, tal como se describen en el presente documento) se administran conjuntamente a un sujeto, cada agente puede residir en el mismo vector o en vectores independientes, y pueden introducirse múltiples vectores (conteniendo cada uno un agente diferente el mismo agente) en una célula o población de células o administrarse a un sujeto.

En determinados casos, el ácido nucleico que codifica para proteínas de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas o TCR recombinantes de alta afinidad específicos para WT-1 puede unirse operativamente a determinados elementos de un vector. Por ejemplo, pueden unirse operativamente secuencias de polinucleótido que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que se ligan. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir secuencias de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencias de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y posiblemente secuencias que potencian la secreción de proteínas. Las secuencias de control de la expresión pueden unirse operativamente si son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés.

En casos particulares, el vector de expresión recombinante se administra a una célula apropiada, por ejemplo, una célula T o una célula presentadora de antígeno, es decir, una célula que presenta un complejo péptido/CMH en su

superficie celular (por ejemplo, una célula dendrítica) y carece de CD8. Por tanto, los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores de la transcripción (TRE) específicos de tejido linfático, tales como TRE específicos de linfocitos B, linfocitos T o células dendríticas. En la técnica se conocen TRE específicos de tejido linfático (véanse, por ejemplo, Thompson *et al.*, Mol. Cell. Biol. 12:1043, 1992); Todd *et al.*, J. Exp. Med. 177:1663, 1993); Penix *et al.*, J. Exp. Med. 178:1483, 1993).

Además de vectores, determinados aspectos se refieren a células huésped que comprenden los vectores que se divulgan en el presente documento. Un experto en la técnica entiende fácilmente que en la técnica hay disponibles muchas células huésped adecuadas. Una célula huésped puede incluir cualquier célula individual o cultivo celular que puede recibir un vector o la incorporación de ácidos nucleicos y/o proteínas, así como cualquier células de progenie. El término también abarca progenie de la célula huésped, ya sea genética o fenotípicamente la misma o diferente. Las células huésped adecuadas pueden depender del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas. Estas células pueden inducirse para incorporar el vector u otro material mediante el uso de un viral vector, transformación a través de precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección u otros métodos. Por ejemplo, véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Métodos de tratamiento

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a métodos para tratar un trastorno o estado hiperproliferativo caracterizado por la sobreexpresión de WT-1 mediante la administración a un sujeto humano que lo necesita de una composición que comprende una proteína de unión o TCR recombinante de alta afinidad específicos para la proteína 1 de tumor de Wilms (WT-1) humana según cualquiera de las proteínas de unión o los TCR mencionados anteriormente.

La presencia de un trastorno hiperproliferativo o estado maligno en un sujeto se refiere a la presencia de células displásicas, cancerosas y/o transformadas en el sujeto, incluyendo, por ejemplo células neoplásicas, tumorales, inhibidas sin contacto o transformadas de manera oncogénica, o similares (por ejemplo, cánceres sólidos; cánceres hemáticos incluyendo linfomas y leucemias, tales como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, etc.), que se conocen en la técnica y para los que se establecen criterios de diagnóstico y clasificación (por ejemplo, Hanahan y Weinberg, 2011 Cell 144:646; Hanahan y Weinberg 2000 Cell 100:57; Cavallo *et al.*, 2011 Canc. Immunol. Immunother. 60:319; Kyrigideis *et al.*, 2010 J. Carcinog. 9:3). En determinados casos, tales células cancerosas pueden ser células de leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica de células B, leucemia linfoblástica de células T o mieloma, incluyendo células madre cancerosas que son capaces de iniciar y trasplantar en serie cualquiera de estos tipos de cáncer (véase, por ejemplo, Park *et al.* 2009 Molec. Therap. 17:219).

En determinados casos, se proporcionan métodos para tratar un trastorno hiperproliferativo, tal como una neoplasia maligna hemática o un cáncer sólido. Las neoplasias malignas hemáticas a modo de ejemplo incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia eosinofílica crónica (LEC), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma no Hodgkin (LNH) o mieloma múltiple (MM).

En casos adicionales, se proporcionan métodos para tratar un trastorno hiperproliferativo, tal como un cáncer sólido que se selecciona de cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, carcinoma de huesos y tejidos blandos, tumor de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, adenocarcinoma colorrectal, cáncer colorrectal, tumor desmoide, cáncer embrionario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multiforme, tumor ginecológico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal de páncreas, tumor astrocítico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdomyosarcoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinativas de testículo, cáncer urotelial, sarcoma uterino o cáncer de útero.

Tal como entiende un experto en la técnica médica, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren a la gestión médica de una enfermedad, un trastorno o un estado de un sujeto (es decir, paciente, huésped, que puede ser un humano o un animal no humano) (véase, por ejemplo, Stedman's Medical Dictionary). En general, una dosis y un régimen de tratamiento adecuados proporcionan uno o más de una proteína de unión o un TCR recombinante de alta afinidad específicos para WT-1 humana (por ejemplo, las SEQ ID NO:1-15 y 21-31, y variantes de las mismas) o una célula huésped que expresa los mismos, y opcionalmente una terapia complementaria (por ejemplo, una citocina tal como IL-2, IL-15, IL-21 o cualquier combinación de las mismas), en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico. El beneficio terapéutico o profiláctico que resulta de los métodos preventivos o profilácticos o de tratamiento terapéutico incluyen, por ejemplo, un desenlace clínico mejorado, en los que el objetivo es prevenir o retardar o reducir de otro modo (por ejemplo, disminuir de manera estadísticamente significativa en relación con un control sin tratar) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, o prevenir, retardar o reducir de otro modo la expansión o gravedad de una enfermedad o un trastorno de este tipo. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados a partir del tratamiento de un sujeto incluyen abatimiento, reducción o alivio de los síntomas que resultan de o están asociados con la enfermedad o el trastorno que va a tratarse; apariencia disminuida de síntomas; calidad de vida mejorada; estado libre de enfermedad más largo (es decir, disminución de la probabilidad o propensión de que el sujeto presente

síntomas a partir de los cuales se realiza el diagnóstico de una enfermedad); disminución de la extensión de la enfermedad; estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento); retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad; mejora o paliación del estado de la enfermedad; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable; o supervivencia global.

“Tratamiento” también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si un sujeto no estuviera recibiendo tratamiento. Los sujetos que necesitan los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen aquellos que ya tienen la enfermedad o el trastorno, así como sujetos propensos a tener o en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno. Los sujetos que necesitan tratamiento profiláctico incluyen sujetos en los que va a prevenirse la enfermedad, el estado o el trastorno (es decir, disminuir la probabilidad de aparición o recidiva de la enfermedad o el trastorno). El beneficio clínico proporcionado por las composiciones (y las preparaciones que comprenden las composiciones) y los métodos descritos en el presente documento pueden evaluarse mediante el diseño y la ejecución de ensayos *in vitro*, estudios preclínicos y estudios clínicos en sujetos a quienes se pretende beneficiar con la administración de las composiciones, tal como se describe en los ejemplos.

Las células que expresan la proteína de unión o el TCR recombinante de alta afinidad específicos para WT-1 humana, tal como se describen en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto en un excipiente o portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable o adecuado. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles, por ejemplo, solución salina fisiológica, que se describen con más detalle en el presente documento, que son adecuados para la administración a un sujeto humano u otro mamífero no humano.

Una dosis terapéuticamente eficaz es una cantidad de células huésped (que expresan una proteína de unión o un TCR recombinante de alta afinidad específicos para WT-1 humana) usada en transferencia adoptiva que es capaz de producir un resultado clínicamente deseable (es decir, una cantidad suficiente para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria de células T específica contra células que sobreexpresan WT-1 (por ejemplo, una respuesta de células T citotóxicas) de manera estadísticamente significativa) en un humano o mamífero no humano tratado. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, la dosificación para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el peso, el área de superficie corporal, la edad, la terapia particular que va a administrarse, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que están administrándose de manera concurrente. Las dosis variarán, pero una dosis preferida para la administración de una célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento es de aproximadamente 10^7 células/m², aproximadamente 5×10^7 células/m², aproximadamente 10^8 células/m², aproximadamente 5×10^8 células/m², aproximadamente 10^9 células/m², aproximadamente 5×10^9 células/m², aproximadamente 10^{10} células/m², aproximadamente 5×10^{10} células/m² o aproximadamente 10^{11} células/m².

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera apropiada para la enfermedad o el estado que va a tratarse (o prevenirse) tal como determinan los expertos en la técnica médica. Una dosis apropiada y una duración y frecuencia de administración adecuadas de las composiciones se determinarán por factores tales como el estado de salud del paciente, el tamaño del paciente (es decir, el peso, la masa o el área corporal), el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del principio activo y el método de administración. En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan las composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (tal como se describe en el presente documento, incluyendo un desenlace clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes, o supervivencia global y/o libre de enfermedad más larga, o una reducción de la intensidad de los síntomas). Para el uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición de o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con enfermedad o trastorno. El beneficio profiláctico de las composiciones inmunogénicas administradas según los métodos descritos en el presente documento puede determinarse realizando estudios preclínicos (incluyendo estudios *in vitro* e *in vivo* en animales) y clínicos y analizando los datos obtenidos a partir de los mismos mediante técnicas y métodos estadísticos, biológicos y clínicos apropiadas, todos ellos pudiéndose practicar fácilmente por un experto en la técnica.

Un estado asociado con la sobreexpresión de WT-1 incluye cualquier trastorno o estado en el que la hipoactividad, hiperactividad o actividad inadecuada de un acontecimiento celular o molecular de WT-1 está presente, y normalmente resulta de niveles inusualmente altos (con significación estadística) de expresión de WT-1 en células afectadas (por ejemplo, células leucémicas), en relación con células normales. Un sujeto que tiene un trastorno o estado de este tipo se beneficiaría del tratamiento con una composición o un método de los aspectos descritos en el presente documento. Por tanto, algunos estados asociados con la sobreexpresión de WT-1 pueden incluir trastornos y enfermedades tanto agudos como crónicos, tales como aquellas patologías que predisponen al sujeto a un trastorno particular.

Algunos ejemplos de estados asociados con la sobreexpresión de WT-1 incluyen trastornos hiperproliferativos, que se refieren a estados de células activadas y/o en proliferación (que también pueden ser hiperactivas de manera transcripcional) en un sujeto, incluyendo tumores, neoplasias, cáncer, neoplasias malignas, etc. Además de células activadas o en proliferación, el trastorno hiperproliferativo también puede incluir una aberración o desregulación de los procesos de muerte celular, ya sean mediante necrosis o apoptosis. Tal aberración de los procesos de muerte celular puede estar asociada con una variedad de estados, incluyendo cáncer (incluyendo neoplasias malignas primarias, secundarias así como metástasis) u otros estados.

Según determinados aspectos, prácticamente cualquier tipo de cáncer que se caracteriza por la sobreexpresión de WT-1 puede tratarse mediante el uso de las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento, incluyendo cánceres hemáticos (por ejemplo, leucemia incluyendo leucemia mielógena aguda (LMA), linfomas de células T o B, mieloma y otros). Además, "cáncer" puede referirse a cualquier proliferación acelerada de células, incluyendo tumores sólidos, tumores ascíticos, neoplasias malignas hemáticas o linfáticas u otras; neoplasias malignas de tejido conjuntivo; enfermedad metastásica; enfermedad residual mínima después de un trasplante de órganos o célula madres; cánceres resistentes a múltiples fármacos, neoplasias malignas primarias o secundarias, angiogénesis relacionada con una neoplasia maligna u otras formas de cáncer. También se contemplan dentro de los aspectos divulgados en el presente documento casos específicos en los que sólo se incluye uno de los tipos de enfermedad anteriores, o en los que pueden excluirse estados específicos independientemente de si están caracterizados o no por la sobreexpresión de WT-1.

Determinados métodos de tratamiento o prevención contemplados en el presente documento incluyen la administración de una célula huésped (que puede ser autóloga, alogénica o singénica) que comprende una molécula de ácido nucleico deseada tal como se describe en el presente documento que se integra de manera estable en el cromosoma de la célula. Por ejemplo, una composición celular de este tipo puede generarse *ex vivo* usando células del sistema inmunitario autólogas, alogénicas o singénicas (por ejemplo, células T, células presentadoras de antígeno, linfocitos citotóxicos naturales) con el fin de administrar una composición de células T que seleccionan como diana WT-1 deseada a un sujeto como inmunoterapia adoptiva.

Tal como se usa en el presente documento, la administración de una composición o terapia se refiere a la administración de la misma a un sujeto, independientemente de la vía o el modo de administración. La administración puede efectuarse de manera continua o intermitente, y por vía parenteral. La administración puede ser para tratar un sujeto que ya se ha confirmado que tiene un estado, una enfermedad o un estado patológico reconocido, o para tratar un sujeto susceptible o en riesgo de desarrollar un estado, una enfermedad o un estado patológico de este tipo. La administración conjunta con una terapia complementaria puede incluir la administración simultánea y/o secuencial de múltiples agentes en cualquier orden y en cualquier pauta posológica (por ejemplo, células huésped recombinantes específicas de WT-1 con una o más citocinas; terapia inmunosupresora tal como inhibidores de calcineurina, corticosteroides, inhibidores de microtúbulos, baja dosis de un profármaco de ácido micofenólico o cualquier combinación de los mismos).

En determinados casos, se administra una pluralidad de dosis de una célula huésped recombinante tal como se describe en el presente documento al sujeto, que pueden administrarse en intervalos entre administraciones de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro semanas. En casos adicionales, una citocina se administra secuencialmente, siempre que se le administrara al sujeto la célula huésped recombinante al menos tres o cuatro veces antes de la administración de la citocina. En determinados casos, la citocina se administra por vía subcutánea (por ejemplo, IL-2, IL-15, IL-21). En todavía casos adicionales, el sujeto que está tratándose recibe además terapia inmunosupresora, tal como inhibidores de calcineurina, corticosteroides, inhibidores de microtúbulos, baja dosis de un profármaco de ácido micofenólico o cualquier combinación de los mismos. En aún casos adicionales, el sujeto que está tratándose ha recibido un trasplante de células hematopoyéticas no mieloablativas o mieloablativas, en el que el tratamiento puede administrarse de al menos dos a al menos tres meses después del trasplante de células hematopoyéticas no mieloablativas.

Una cantidad eficaz de una composición terapéutica o farmacéutica se refiere a una cantidad suficiente, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr los resultados clínicos deseados o un tratamiento beneficioso, tal como se describe en el presente documento. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Si la administración es a un sujeto que ya se sabe o conoce que tiene una enfermedad o un estado patológico, el término "cantidad terapéutica" puede usarse en referencia a tratamiento, mientras que "cantidad profilácticamente eficaz" puede usarse para describir la administración de una cantidad eficaz a un sujeto que es susceptible o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o un estado patológico (por ejemplo, recidiva) como transcurso preventivo.

El nivel de una respuesta inmunitaria de CTL puede determinarse mediante uno cualquiera de numerosos métodos inmunológicos descritos en el presente documento y practicados de manera rutinaria en la técnica. El nivel de una respuesta inmunitaria de CTL puede determinarse antes y después de la administración de una cualquiera de las proteínas de unión específicas de WT-1 descritas en el presente documento expresadas por, por ejemplo, una célula T. Los ensayos de citotoxicidad para la determinación de la actividad de CTL pueden realizarse usando una cualquiera de varias técnicas y varios métodos practicados de manera rutinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Henkart *et al.*, "Cytotoxic T-Lymphocytes" en *Fundamental Immunology*, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA), páginas 1127-50 y las referencias citadas en el mismo).

Las respuestas de células T específicas de antígeno se determinan normalmente mediante comparaciones de las respuestas de células T observadas según uno cualquiera de los parámetros funcionales de células T descritos en el presente documento (por ejemplo, proliferación, liberación de citocinas, actividad de CTL, fenotipo de marcador de superficie celular alterado, etc.) que pueden realizarse entre células T que se exponen a un antígeno relacionado en

un contexto apropiado (por ejemplo, el antígeno usado para cebar o activar las células T, cuando se presentan por células presentadoras de antígeno inmunocompatibles) y células T de la misma población fuente que se exponen en su lugar a un antígeno de control estructuralmente distinto o irrelevante. Una respuesta al antígeno relacionado que es mayor, con significación estadística, que la respuesta al antígeno de control significa especificidad de antígeno.

Una muestra biológica puede obtenerse de un sujeto para determinar la presencia y el nivel de una respuesta inmunitaria a un péptido antigénico derivado de WT-1 tal como se describe en el presente documento. Una "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, puede ser una muestra de sangre (a partir de la cual puede prepararse suero o plasma), muestra de biopsia, líquidos corporales (por ejemplo, lavado pulmonar, ascitis, lavados mucosos, líquidos sinoviales), médula ósea, ganglios linfáticos, explanto de tejido, cultivo de órgano o cualquier otra preparación de tejido o celular del sujeto o una fuente biológica. Las muestras biológicas también pueden obtenerse del sujeto antes de recibir cualquier composición inmunogénica, cuya muestra biológica es útil como control para establecer los datos del nivel inicial (es decir, antes de la inmunización).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden presentarse en recipientes de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas o viales sellados. Tales recipientes pueden congelarse para preservar la estabilidad de la formulación hasta. En determinados casos, una dosis unitaria comprende una célula huésped recombinante tal como se describe en el presente documento a una dosis de aproximadamente 10^7 células/m² a aproximadamente 10^{11} células/m². El desarrollo de pautas posológicas y regímenes de tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración o formulación parenteral o intravenosa.

Si la composición objeto se administra por vía parenteral, la composición también puede incluir una disolución o suspensión acuosa u oleaginosa estéril. Los diluyentes o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados incluyen agua, disolución de Ringer, solución salina isotónica, 1,3-butanodiol, etanol, propilenglicol o polietilenglicoles en mezclas con agua. Las disoluciones o suspensiones acuosas pueden comprender además uno o más agentes tamponantes, tales como acetato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o tartrato de sodio. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier formulación unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente pura y sustancialmente no tóxica en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida. La forma unitaria de dosificación, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente independientes adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; cada unidad puede contener un cantidad predeterminada de células recombinante o compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un portador farmacéutico apropiado.

En general, una pauta posológica y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan las moléculas activas o células en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico. Una respuesta de este tipo puede monitorizarse estableciendo un desenlace clínico mejorado (por ejemplo, remisiones completas o parciales más frecuentes, o supervivencia libre de enfermedad más larga) en sujetos tratados en comparación con sujetos sin tratar. Los aumentos en las respuestas inmunitarias preexistentes con respecto a una proteína tumoral se correlacionan generalmente con un desenlace clínico mejorado. Tales respuestas inmunitarias pueden evaluarse generalmente usando ensayos de proliferación, citotoxicidad o citocinas convencionales, que son rutinarios en la técnica y pueden realizarse usando muestras obtenidas de un sujeto antes y después del tratamiento.

Ejemplos

EJEMPLO 1

MÉTODOS

Constructos lentivirales

Se generaron diversos constructos de expresión de TCR que contenían genes de TCR α y TCR β con codones optimizados, derivados de un clon de células T CD8⁺ restringido por HLA-A2 (C4), que codifica para un TCR de alta afinidad específico para un péptido de WT-1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16) que forma un complejo con un receptor de HLA. Se unieron las moléculas de ácido nucleico que codifican para TCR α y TCR β mediante un elemento 2A del teschovirus porcino (P2A) para garantizar la expresión coordinada bajo el control de un promotor del virus de células madre murinas (MSCV) U3. En determinados casos, se modificaron las porciones de las moléculas de ácido nucleico que codifican para los dominios constantes de TCR α y TCR β de C4 para expresar residuos de cisteína complementarios en las posiciones 48 (Thr por Cys) y 57 (Ser por Cys), respectivamente, para fomentar el apareamiento entre cadenas de las cadenas del TCR de C4 y para minimizar el apareamiento erróneo de las cadenas de TCR de C4 exógenas con cadenas de TCR endógenas.

El vector pRRLSIN-C4 α -P2A-C4 β contenía el constructo de expresión de TCR ligado en el vector lentiviral pRRLSIN.cPPT.MSCV/GFP.WPRE entre los sitios de endonucleasa de restricción *Ascl* y *SaI*, reemplazando a GFP. El plásmido pRRLSIN.cPPT.MSCV/GFP.WPRE es un vector lentiviral autoinactivante de tercera generación (véase

Yang *et al.*, J. Immunother. 31:830, 2008).

Bibliotecas de mutagénesis por saturación

5 Se construyeron dos bibliotecas de mutagénesis por saturación para generar e identificar mutaciones dentro de las regiones CDR de C4 α (particularmente la CDR3) que dieron como resultado una mayor afinidad o afinidad potenciada por el complejo de HLA-A2/WT-1. La región CDR3 de C4 α se compone de los siguientes aminoácidos: CAATEDYQLIW (SEQ ID NO.:25). Se construyeron dos bibliotecas aleatorizadas que abarcaban los residuos ATE y DYQ usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange II (Agilent), usando el vector lentiviral pRRLSIN-C4 α -P2A- β como molde. Se diseñaron cebadores de mutagénesis según el protocolo de Quikchange modificado descrito por Zheng *et al.* (Nucleic Acids Res. 32:e115, 2004) y se incorporaron nucleótidos NNK aleatorizados (en los que N = A, C, G o T y K = G o T) para cada posición de aminoácido que va a aleatorizarse. Esto produjo 32 codones diferentes, que codifican para los 20 aminoácidos, y un codón de parada. Se transformaron células T1 Electromax DH10B de eficiencia de alta transformación (mayor de 1×10^{10}) con la composición de reacción de mutagénesis y se determinó el número de clones independientes titulando y cultivando una fracción de la reacción de transformación en placas de LB-ampicilina. Después de determinar el número total de clones, se sembró en placa la mezcla de transformación en placas de LB-ampicilina a aproximadamente 5.000 clones por placa. Después de 18 horas de cultivo a 37°C, se añadieron 0,5-1 ml de LB a las placas con bibliotecas y se recogieron juntas todas las colonias, se centrifugaron y se aisló ADN de biblioteca de plásmidos de alta calidad usando el kit Endofree plasmid Maxi (Qiagen).

20 Se estimó que el tamaño de la biblioteca incluía aproximadamente 100.000 clones independientes, lo que se estimó que daba como resultado una biblioteca que estaba completa en aproximadamente el 95%. Para medir la eficiencia de la reacción mutagénesis y la diversidad de la biblioteca, se secuenció el ADN plasmídico de la biblioteca combinada y se determinó que la proporción de cada nucleótido en cada una de las posiciones aleatorizadas era equivalente comparando la señal relativa para cada nucleótido en un cromatograma de secuenciación (datos no mostrados).

Selección de bibliotecas de mutagénesis por saturación

30 Para cada biblioteca, se generó lentivirus transduciendo tres placas de células 293T (aproximadamente 7×10^6 células/placa) con la biblioteca de plásmidos de alta calidad, simultáneamente con los tres vectores de empaquetamiento pMDLg/pRRE, pMD2-G y pRSV-REV. Después de 2 días, se combinaron los sobrenadantes de las tres placas y se congelaron alícuotas para uso futuro.

35 Se tituló el sobrenadante lentiviral para determinar la concentración óptima para su utilización para las transducciones con el fin de minimizar la probabilidad de que las células diana se transduzcan con más de un TCR derivado de las bibliotecas. Se determinó la eficiencia de transducción total analizando el porcentaje de células que expresan la cadena beta transgénica (V β 17). Se eligió una dilución que produjo una tasa de transducción de aproximadamente el 20% y se usó para transducir aproximadamente $2-5 \times 10^7$ células J.RT3. Se clasificaron las células transducidas de las bibliotecas mediante citometría de flujo para determinar altos niveles de tinción con tetrámero de WT-1 en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CMH de clase I competidor y se expandieron en cultivo múltiples veces. Se lisaron las poblaciones clasificadas que se unieron al tetrámero de WT-1 a mayores niveles que las células J.RT3 transducidas con el constructo C4 α -P2A-C4 β parental y se aisló el ADN genómico usando un kit DNeasy (Qiagen). Se usó el ADN aislado para la amplificación por PCR del inserto lentiviral usando cebadores que flanquean el constructo de expresión de TCR y que produjeron una sola banda del tamaño correspondiente. Se clonó el producto de PCR en pENTR-D-Topo (Invitrogen) y se caracterizaron los clones mediante análisis de secuencias de ADN.

45 Tras el análisis de secuencias de los clones aislados, se escindió un fragmento *Ascl-BamHI* de 750 pb que contenía la región CDR3 de C4 α a partir de los clones candidatos y se ligó en el vector pRRLSIN-C4 α -P2A-C4 β parental. Luego se transdujeron los mutantes candidatos en células J.RT3 y PBMC junto con el constructo C4 parental y se evaluaron los mutantes para determinar la afinidad de unión a HLA-A2/WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ (RMFPNAPYL, SEQ ID NO.:16).

Afinidad relativa mediante titulación con tetrámeros

55 Se tiñeron los clones de células T con diluciones en serie al 50% de tetrámero de WT-1 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se realizó el análisis estadístico en Graphpad Prism. Se extrapolaron los valores de K_D usando un algoritmo de regresión no lineal a una curva de unión de saturación con la fórmula $Y = B_{\text{máx}} * X / [K_D + X]$.

EJEMPLO 2

IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE TCR ESPECÍFICOS DE WT-1 DE ALTA AFINIDAD

60 Con el fin de identificar clones de células T específicos de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ restringidos por HLA-A2 de alta afinidad, se generaron clones de células T a partir del repertorio periférico de más de 50 donantes. Se evaluaron adicionalmente los diez mejores clones que mostraron la mayor afinidad aparente mediante tinción con tetrámero tiñendo cada con

concentraciones tituladas de tetrámero de WT-1 y ajustando los datos de intensidad de fluorescencia media resultantes a una curva de unión de saturación (figura 1). Se identificaron las secuencias de los genes de TCR α y TCR β mediante RACE PCR y se realizó la secuenciación de los cuatro clones con la mayor afinidad relativa (C4, P1, P20 y P22).

Para caracterizar adicionalmente los TCR específicos de WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ a partir de estos clones de células T candidatos, se generaron constructos de expresión con codones optimizados para cada par de cadenas TCR α y TCR β . Para cada constructo, se separaron las cadenas α y β por un elemento P2A para fomentar la expresión coordinada de las cadenas TCR α y TCR β (véanse, por ejemplo, Szymczak *et al.*, Nat. Biotechnol. 22:589, 2004; Dossett *et al.*, Mol. Ther. 17:742, 2009). Además, se introdujeron mutaciones puntuales para crear un segundo par de residuos de cisteína en las regiones proximales a la membrana externa de los dominios constantes de TCR α y TCR β para fomentar el apareamiento preferencial de las cadenas de TCR introducidas (Kuball *et al.*, Blood 109:2331, 2007). Finalmente, se clonaron estos constructos modificados con cisteína con codones optimizados en el vector lentiviral pRRLSIN.cPPT-MSCV.WPRE (véase la figura 3C).

A continuación, se examinó la capacidad de cada uno de los pares de TCR $\alpha\beta$ introducidas competir con las cadenas de TCR endógenas para la asociación con componentes de CD3 y la expresión en la superficie de células T (véase, por ejemplo, Heemskerk *et al.*, Blood 109:235, 2007). Se transdujeron TCR_{C4}, TCR_{P20} y TCR_{P22} modificados con cisteína con codones optimizados en PBMC y se determinó el porcentaje de células positivas para tetrámero dentro de la población de células T CD8⁺ transducida (figura 2A). Se determinó la población transducida total restando el porcentaje de expresión de cadenas V β endógenas en el control sin transducir del porcentaje de células T específicas de V β de TCR en las poblaciones transducidas (figura 2A).

Para determinar la capacidad de cada TCR para unirse a tetrámero independientemente de CD8, que está asociado con alta afinidad por el péptido/CMH, se seleccionaron PBMC transducidas en células T CD4⁺ y se evaluó la tinción con tetrámero de WT-1 (figura 2B). Ambos clones, TCR_{C4} y TCR_{P1}, se unieron al tetrámero independientemente de CD8. Además, TCR_{C4} mostró los mayores niveles de tinción con tetrámero independientemente de CD8 y las PBMC transducidas con el constructo TCR_{C4} mostraron el mayor porcentaje de células T positivas para tetrámero de WT-1. Se seleccionó el clon TCR_{C4} modificado con cisteína con codones optimizados, que también mostró la mayor afinidad relativa de entre todos los clones estudiados, para los estudios de modificación y funcionales.

EJEMPLO 3

MEJORA DEL CONSTRUCTO TCR_{C4} ESPECÍFICO DE WT-1 DE ALTA AFINIDAD

Tal como se describe en el ejemplo 2, se generó el constructo de expresión TCR_{C4} de tipo natural (WT) (C4 $\alpha\beta$ WT) a partir de TCR α y TCR β de cadena completa producidas mediante PCR 5'-RACE a partir del clon TCR_{C4}. Este constructo incluía el ácido nucleico que codifica para la cadena TCR α de C4 en la posición 5', seguido por un elemento P2A, y luego el ácido nucleico que codifica para la cadena TCR β de C4. Aunque las células T que expresan este constructo expresaron niveles similares de cadena V β 17 transgénica en la superficie celular, la tinción con tetrámero de WT-1 fue esencialmente indetectable, lo que indica que, a pesar de la modificación con cisteína, este constructo no dio como resultado una expresión génica de TCR suficiente para competir con el TCR endógeno. Tal como se describe en el ejemplo 2, la siguiente etapa fue generar un constructo TCR_{C4} con codones optimizados (véase Scholten *et al.*, Clin. Immunol. 119:135, 2006), que mostró un aumento sustancial en la tinción con tetrámero (véanse las figuras 2A y 3A).

Se examinaron los constructos de C4 $\alpha\beta$ y C4 $\beta\alpha$ para determinar si un efecto posicional de las cadenas variables podría influir en la expresión en superficie de TCR_{C4} (véase Leisegang *et al.*, J. Mol. Med. 86:573, 2008). Las figuras 3A y 3B muestran un claro aumento de la tinción con tetrámero cuando se posicionó la cadena TCR β de C4 en 5' del elemento P2A, y este efecto fue más pronunciado después de la estimulación en puntos de tiempo tardíos, lo que indica que el constructo de TCR de C4 $\alpha\beta$ fue relativamente menos eficiente que el constructo de TCR de C4 $\beta\alpha$ en la competición por la expresión en superficie con el TCR endógeno, que se regula por disminución tras la estimulación de células T inicial, y aumenta gradualmente con el tiempo.

Estos datos indican que (1) el constructo de TCR de C4 $\beta\alpha$ fue más eficiente en la competición por la expresión en superficie con el TCR endógeno que el constructo de TCR de C4 $\alpha\beta$, y (2) el P2A 21 de aminoácidos afectó a la función de la proteína TCR α más que la proteína TCR β cuando se ubicó en posición 5' del constructo TCR_{C4} unido a P2A.

EJEMPLO 4

ESTABILIDAD EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS DE TCR_{C4} ESPECÍFICO DE WT-1 FUNCIONAL

Con el fin de estudiar la estabilidad de la expresión de TCR_{C4} funcional en la superficie de células T transducidas, se estimularon células T CD8⁺ de un donante A2+ con péptido de VEB GLCTLVAML (SEQ ID NO.:127) para generar una población de células T específicas de VEB para la que pudo monitorizarse la expresión de TCR endógeno mediante tinción con tetrámero de VEB. Se transdujeron las células T con el constructo de expresión TCR_{C4} 24 horas después

de la estimulación con péptido de VEB, dando como resultado la transducción preferencial de células T específicas de VEB. Este enfoque dio como resultado una población de células T VEB⁺, una población fácilmente detectable de células T doblemente positivas (DP) tetrámero de WT-1⁺/tetrámero de VEB⁺ transducidas con TCR_{C4}, y una población de células T tetrámero de WT-1⁺ y tetrámero de VEB⁺ transducidas con TCR_{C4} que o bien no fueron reactivas para VEB o bien que habían perdido la expresión en superficie de TCR de VEB debido a la competición con TCR_{C4} (figura 8A).

Luego se clasificó y expandió cada una de estas poblaciones para evaluar directamente la estabilidad de la expresión de TCR_{C4} funcional en células que expresan conjuntamente un TCR reactivo para VEB (figura 8B). Después de 12 días, se analizaron los cultivos para determinar la tinción con tetrámero de WT-1 y VEB. Las poblaciones de células T que se unieron inicialmente sólo a uno de los tetrámeros permanecieron casi exclusivamente positivas únicas (SP). Sin embargo, las células T que fueron uniformemente DP para ambos tetrámeros tras la clasificación celular se convirtieron preferencialmente en positivas únicas para la expresión de tetrámero de WT-1 tras 12 días de cultivo *in vitro*, mientras que muy pocas células fallaron en la tinción con tetrámero de WT-1 en convertirse en SP de VEB (figura 8B). Estos resultados indican que TCR_{C4} puede competir fácilmente con TCR endógenos para la expresión en superficie.

Para determinar si la población SP de tetrámero de WT-1 contiene principalmente células que habían competido con el TCR endógeno por la expresión en superficie, se clasificaron células T tetrámero de VEB⁺, y luego se transdujo esta población purificada con el constructo TCR_{C4} tras la reestimulación con anticuerpo anti-CD3/CD28 o se reestimuló sin manipulación adicional (figura 8C). Las células T específicas de VEB que se transdujeron con el constructo TCR_{C4} se unieron casi exclusivamente al tetrámero de WT-1, lo que indica que TCR_{C4} es capaz de competir con la mayoría de TCR endógenos para la expresión en la superficie de células T.

EJEMPLO 5

GENERACIÓN DE TCR ESPECÍFICOS DE WT-1 DE ALTA AFINIDAD VARIANTES

Incluso los clones de células T específicos de WT-1 de la mayor afinidad identificados a partir del repertorio periférico de células T tendrán generalmente una afinidad atenuada en comparación con células T específicas para no autoantígenos (por ejemplo, antígenos virales), debido a la influencia de la selección negativa durante el desarrollo de células T, que fomenta la autotolerancia y protege contra la autoinmunidad. Por consiguiente, se usaron técnicas de mutagénesis por saturación para generar e identificar TCR de alta afinidad que tienen afinidad potenciada *in vitro*. Se generaron dos bibliotecas de mutagénesis por saturación que atraviesan la región CDR3 de la cadena C4 α de TCR (CAATEDYQLIW, SEQ ID NO.:25), tal como se describe en el ejemplo 1. Se examinaron ambas bibliotecas en busca de variantes que tenían una afinidad potenciada por el epítipo de WT-1 tras la transducción en células J.RT3 seguido por clasificación celular basándose en un alto nivel de unión de tetrámero de HLA-A2/WT-1.

Se aislaron variantes de unión a tetrámero de HLA-A2/WT-1 candidatas de ambas bibliotecas, y una variante que tenía una mutación DYQ por DLT (C4-DLT) mostró niveles mayores de unión a de tetrámeros HLA-A2/WT-1 en comparación con el TCR de C4 sin mutar (C4-WT), y se encontró que tenía una cinética de unión en equilibrio potenciada al tetrámero de HLA-A2/WT-1 (figura 4A). Cabe destacar que estos experimentos se realizaron en presencia de CD8, que contribuye significativamente a interacciones TCR-péptido/CMH que, por tanto, pueden disminuir las diferencias aparentes en la afinidad relativa entre TCR.

Cuando se transfirió en células T CD8⁺ y se evaluó para determinar la capacidad de destruir células diana pulsadas con concentraciones decrecientes de péptido, C4-DLT mostró un aumento de 5-10 veces en la sensibilidad al antígeno en comparación con C4-WT (figura 4B), y se observó un aumento similar en la sensibilidad al antígeno cuando se sometió a ensayo la producción de citocinas (IFN γ) en respuesta a concentraciones limitantes de péptido (figura 4C). Del mismo modo, las células T que expresan C4-DLT mostraron una destrucción potenciada (a través de la activación de caspasa-3) en comparación con células T que expresan C4-WT cuando se selecciona como diana HLA-2 que expresa una versión de la línea de células de leucemia K562, que expresa WT-1, y pueden procesar y presentar el epítipo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16) del péptido de WT-1 a C4-WT y C4-DLT cuando se transducen con HLA-A2 (figura 5).

EJEMPLO 6

ACTIVIDAD CINÉTICA Y CITOLÍTICA DE MUTANTES C4 α DE TCR EN COMPARACIÓN CON TCR DE C4 DE TIPO NATURAL

Se transdujeron HPC CD34⁺ derivadas de sangre de cordón umbilical para expresar la cadena TCR α de un TCR específico de WT-1 restringido por HLA-A2 de alta afinidad (TCR_{C4}) estudiado en los ensayos clínicos tal como se describe en el ejemplo 7. Se cultivaron células transducidas en células OP9-DL1 que expresan HLA-A2 (OP9-A2-DL1) en presencia de péptido de WT-1. Como control positivo, también se transdujeron HSC de sangre de cordón umbilical con las cadenas tanto TCR α como TCR β de TCR_{C4} (C4 $\alpha\beta$). La mayoría de progenitores de células T $\gamma\delta$ humanas

expresan CD4 y CD8 durante el desarrollo en OP9-DL1 (Van Coppenolle *et al.*, Leukemia 26:127, 2011), sin embargo, dado que las células T $\gamma\delta$ fenotípicamente maduras (similares a células CD24⁺ de ND murina) expresan altos niveles de CD27 (Van Coppenolle *et al.*, J. Immunol. 183:4859, 2009), se usaron la expresión de CD27 y la cadena TCR β de V β 17 parental para enriquecer las células T seleccionadas por agonistas. Se analizó la proporción relativa de células CD3⁺CD27⁺ para células sin transducir, transducidas con C4 α y transducidas con C4 $\alpha\beta$ después de 31 días de cultivo *in vitro*. La mayoría de las células en los cultivos transducidos con C4 $\alpha\beta$ fueron CD3⁺CD27⁺. Los cultivos transducidos con C4 α tuvieron un porcentaje aumentado de células CD3⁺CD27⁺ en comparación con controles sin transducir y un aumento de 5 veces en el porcentaje de células CD3⁺ que expresan V β 17 parental (figura 6A). Se recogieron sólo células V β 17⁺CD27⁺ para la construcción de bibliotecas de TCR β el día 34 de cultivo (figura 6B).

Se transdujeron las bibliotecas de V β 17-C β 1 y V β 17-C β 2 en células H9.CD8-C4 α y se clasificaron para determinar las células tetrámero de WT-1⁺ dentro de la población transducida. Después de una sola clasificación con tetrámero de WT-1-CMH, las células transducidas con la biblioteca de V β 17-C β 1 mostraron un intervalo de reactividad de tetrámeros, lo que indica que las múltiples cadenas TCR β presentes en la población clasificada con V β 17 pudieron otorgar especificidad de antígeno WT-1. Se aislaron las células que mostraron el mayor nivel de tinción con tetrámero de WT-1-CMH mediante una segunda clasificación con tetrámero de WT-1-CMH, y se compararon con células H9.CD8-C4 α que expresan la cadena C4 β parental. Si bien ambas poblaciones de células transducidas expresaron niveles similares de V β 17, se observó una tinción con tetrámero sustancialmente mayor para las células tetrámero^{hi} enriquecidas a partir de la biblioteca de V β 17-C β 1 (figura 6C). En algún caso, estas cadenas TCR β derivadas de la biblioteca de C β 1 de alta afinidad pueden tener utilidad como receptores específicos de WT-1 de segunda generación en ensayos de terapia génica con TCR.

Se obtuvo la línea de empaquetamiento retroviral PlatE de Cell Biolabs (San Diego, CA). Se generó la línea de células OP9-K^bD^bDL1 mediante la transducción de la línea de células OP9 (Riken, Japón) con un constructo retroviral que contenía el gen Dll-1 seguido por IRES y H-2D^b (para generar células OP9-K^bDL1) y se transdujo por separado con H-2K^b. Se transdujo adicionalmente la línea de células OP9-K^bD^bDL1-WT-1 para expresar WT-1 murina. Se generó la línea de células OP9-A2-DL1 mediante la transducción de células OP9-K^bDL1 con un constructo retroviral que codifica para HLA-A2-IRES- β 2M humano. Se obtuvieron células OP9 y un constructo retroviral que contenía el gen Dll-1 seguido por IRES-GFP del laboratorio de Juan Carlos Zúñiga-Pflücker. Se generó la línea de células 58^{-/-}3D-PYY α mediante transducción retroviral de la línea de células 58^{-/-} deficiente en TCR α /TCR β con Mig2-3D-PYY α . Se generó la línea de células H9.CD8-C4 α mediante transducción lentiviral de la línea de células T H9 humana con un constructo CD8 α -P2A- β seguido por transducción lentiviral para expresar C4 α -IRES-GFP.

EJEMPLO 7

LAS CÉLULAS T CD8⁺ ESPECÍFICAS DE VIRUS DERIVADAS DE DONANTE QUE EXPRESAN UN RECEPTOR DE CÉLULAS T ESPECÍFICO DE WT-1 PROPORCIONAN ACTIVIDAD DE RECIDIVA ANTILEUCÉMICA EN PACIENTES CON LMA

La recidiva es la causa principal de muerte tras el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) alogénico para las neoplasias malignas hemáticas. Aunque las evidencias sugieren que el efecto beneficioso del injerto contra leucemia (ICL) mediado por células T de donante puede reducir las tasas de recidiva tras TCH, a menudo este efecto se ve mitigado por la morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) acompañante. Por tanto, proporcionar células T específicas de antígeno que seleccionan como diana selectivamente antígeno asociado a leucemia (AAL) puede proporcionar una oportunidad distinta para fomentar la actividad de GVL sin inducir EICH. La proteína 1 de tumor de Wilms (WT-1) es un factor de transcripción de dedos de zinc no polimórfico que desempeña un papel clave en el crecimiento y la diferenciación celular. WT-1 tiene una expresión muy limitada en tejidos adultos normales, se expresa 10-1000 veces más en células de leucemia en comparación con células CD34⁺ normales, y se ha demostrado que contribuye a la leucemogénesis. Además, la magnitud de expresión de WT-1 en células leucémicas se correlaciona con el pronóstico y la agresividad clínica. WT-1 es inmunogénica y, por tanto, constituye una diana inmunoterapéutica candidata atractiva para respuestas de células T citotóxicas (CTL) CD8⁺ inducidas (Cheever *et al.*, Clin. Cancer Res. 15:5323, 2009). Los clones de CTL CD8⁺ reactivos para WT-1 derivados de donante transferidos pueden persistir en pacientes después del trasplante y mediar en la actividad antileucémica (Chapuis *et al.*, Sci. Transl. Med. 5:174ra27, 2013).

En este estudio, se administraron dosis crecientes de células T CD8⁺ específicas de virus derivadas de donante que se habían transfectado para expresar un receptor de células T de alta afinidad específico para el epítipo WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ restringido por HLA A*02:01 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO.:16) a pacientes con leucemia mielógena aguda (LMA) de alto riesgo después de TCH alogénico, con dosis crecientes retenidas si persistió una dosis previa a una frecuencia de >3% de células T CD8⁺ de sangre periférica. En un punto de observación, en el que nueve pacientes se habían tratado en el estudio y recibieron un total de 22 infusiones, tres (3) pacientes habían completado las cuatro infusiones de células T, con la última infusión seguida por un transcurso de dos semanas de IL-2. Los acontecimientos adversos de grado \geq 3 de CTC habían sido hipotensión transitoria y una reacción febril, y leucopenia, linfopenia y trombocitopenia transitorias. No se habían observado toxicidades orgánicas específicas atribuidas a las células T

infundidas. Un paciente había experimentado exacerbación de EICH aguda después de la infusión de células T y un paciente desarrolló EICH crónica, aunque no hubo evidencias de que la EICH en ninguno de los pacientes reflejara actividad de las células T infundidas.

- 5 Tres pacientes que se trataron con células T después de un segundo TCH alogénico para LMA recidivante (dos de los cuales tenían enfermedad persistente/recidivante después de un segundo trasplante) estaban vivos sin evidencias de enfermedad 14, 8 y 7 meses después del inicio de la infusión de células T (por consiguiente, 16, 26 y 9 meses después del segundo trasplante) sin terapia antileucémica adicional después de completar el tratamiento de estudio. Un paciente con LMA de alto riesgo que se trató de manera profiláctica después del TCH alogénico para LMA en segunda remisión completa (CR2) estaba vivo y sin evidencias de enfermedad 13 meses después del inicio del tratamiento de estudio (15 meses después del trasplante) (tabla 1).

Se observó que la persistencia de los CTL transducidos *in vivo* era variable, con CTL transferidos detectables entre 4 y al menos 290 días después de las infusiones de células T (tabla 1, figura 7).

Tabla 1. Desenlaces clínicos

Paciente	Diagnóstico	Estado de la enfermedad antes del tratamiento de estudio	Carga de morbilidad durante la infusión de células T	Número de infusiones	Persistencia de CTL (días después de la última infusión)	Desenlace*	Supervivencia*
1	LMA	Recidiva 5 años después del TCH alogénico (enfermedad medular y extramedular)	Presente	3	14+	Enfermedad progresiva	Vivo
2	LMA	Recidiva 10 años después del primer TCH alogénico. MRD temprana después del segundo TCH	Presente	4(+IL2)	290+	Remisión 16 meses después del trasplante	Vivo
3	LMA	TCH en CR2. Sin evidencias de enfermedad después del TCH	Ausente	4(+IL2)	20	Remisión 15 meses después del trasplante	Vivo
4	LMA	Recidiva con enfermedad extramedular un año después del segundo TCH alogénico	Ausente	1	210+	Remisión 26 meses después del trasplante (8 meses después del tratamiento)	Vivo
5	SMD → LMA	Enfermedad persistente después del TCH	Presente	1	5+	Enfermedad progresiva	Muerto
6	LMA	Segundo TCH por recidiva 4 años después del primer TCH	Ausente	4(+IL2)	4	Remisión 9 meses después del trasplante	Vivo

7	LMA	Enfermedad persistente después del TCH	Presente	1	30+	Enfermedad progresiva	Muerto
8	LMA	TCH en CR2. MRD temprana después del trasplante	Presente	1	50+	Tratamiento en curso	Vivo
9	LMA	TCH en CR2. Recidiva temprana después del trasplante	Ausente	3	14+	Tratamiento en curso	Vivo

* a partir de julio de 2014

+ células T persistentes detectadas en el análisis más reciente a partir de la evaluación

Estos resultados preliminares de este estudio indican que pudo lograrse la transferencia de células T CD8⁺ específicas de virus derivadas de donante transducidas para expresar un receptor de células T específico de WT-1 divulgado en el presente documento (cadena α SEQ ID NO.:5 ó 6 y cadena β SEQ ID NO.:12 ó 13, respectivamente) sin toxicidad significativa y que tal terapia pudo proporcionar actividad antileucémica.

Lista de secuencias

10 <110> Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson
Schmitt, Thomas M.
Greenberg, Philip D.
Nguyen, Hieu

15 <120> INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS T ESPECÍFICA PARA WT-1

<130> 360056.427WO

<140> PCT

20 <141> 30-07-2015

<150> documento US 62/164.783

<151> 21-05-2015

25 <150> documento US 62/033.045

<151> 04-08-2014

<160> 127

30 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena C4 alfa

40 <400> 1

```

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

```

<210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena C4 alfa-DLT
 <400>

```

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

```

<210> 3
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio constante de cadena (C4alfa, P1, P18)
 <400> 3

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

<210> 4

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio constante (T177C, T185C, T184C) de cadena (C4alfa, P1, P18)

<400> 4

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

15 <210> 5

<211> 270

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena C4alfa

<400> 5

25

Met	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp
1				5					10					15	
Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val
			20					25					30		
Gln	Glu	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala
		35					40					45			
Ser	Asn	Tyr	Phe	Pro	Trp	Tyr	Lys	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Pro	Gln
50						55					60				
Leu	Ile	Ile	Asp	Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg
65					70					75					80
Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile
				85				90						95	
Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr
			100					105					110		
Glu	Asp	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys
		115					120					125			
Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser
130						135					140				
Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln
145					150					155					160
Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys
				165					170					175	
Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val
			180					185					190		
Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn
		195					200					205			
Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys
210						215					220				
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn
225					230					235					240
Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val
				245					250					255	
Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
			260					265					270		

<210> 6

<211> 270

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena C4alfa (T177C)

10

<400> 6

Met	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp
1				5				10					15		
Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val
			20					25					30		
Gln	Glu	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala
			35					40					45		
Ser	Asn	Tyr	Phe	Pro	Trp	Tyr	Lys	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Pro	Gln
	50					55					60				
Leu	Ile	Ile	Asp	Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg
65					70					75				80	
Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile
				85					90					95	
Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr
			100					105					110		
Glu	Asp	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys
		115					120					125			
Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser
	130					135					140				
Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln
145					150					155					160
Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys
				165					170					175	
Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val
			180					185					190		
Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn
		195					200					205			
Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn
225					230					235				240	
Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val
				245					250					255	
Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
			260					265					270		

<210> 7

<211> 270

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena C4alfa-DLT

10

<400> 7

Met	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp
1				5					10					15	
Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val
			20					25					30		
Gln	Glu	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala
		35					40					45			
Ser	Asn	Tyr	Phe	Pro	Trp	Tyr	Lys	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Pro	Gln
	50					55					60				
Leu	Ile	Ile	Asp	Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg
65					70					75					80
Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile
				85					90					95	
Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr
			100					105					110		
Glu	Asp	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys
		115					120					125			
Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser
	130					135					140				
Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln
145					150					155					160
Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys
				165					170					175	
Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val
		180						185					190		
Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn
		195					200					205			
Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn
225					230					235					240
Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val
			245						250					255	
Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
			260					265					270		

<210> 8

5 <211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena C4alfa-DLT (T177C)

<400> 8

Met	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp
1				5					10					15	
Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val
			20					25					30		
Gln	Glu	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala
		35					40					45			
Ser	Asn	Tyr	Phe	Pro	Trp	Tyr	Lys	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Pro	Gln
50						55					60				
Leu	Ile	Ile	Asp	Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg
65					70					75					80
Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile
				85					90					95	
Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr
			100					105					110		
Glu	Asp	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys
		115					120					125			
Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser
130						135					140				
Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln
145					150					155					160
Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys
				165					170					175	
Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val
			180					185					190		
Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn
		195					200					205			
Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys
210					215						220				
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn
225					230					235					240
Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val
				245					250					255	
Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
			260					265					270		

<210> 9
 <211> 131
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena C4beta

10 <400> 9


```

Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala
 1          5          10          15
Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg
          20          25          30
Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His
          35          40          45
Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu
 50          55          60
Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala
 65          70          75          80
Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr
          85          90          95
Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser
          100          105          110
Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
          115          120          125
Thr Val Thr
          130

```

<210> 10
 <211> 179
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta

<400> 10

```

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

```

15 <210> 11
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> dominio constante (S188C, S191C, S190C, S186C) de cadena (C4, P1, P15, P22)beta

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 310
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena C4beta

10 <400> 12

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

				165					170					175		
Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	
			180						185					190		
Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	
		195					200						205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	
	210					215					220					
Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	
				245					250					255		
Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	
			260					265					270			
Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	
	290					295					300					
Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly											
305					310											

<210> 13
 <211> 310
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena C4beta (S188C)

10 <400> 13

Met	Ser	Asn	Gln	Val	Leu	Cys	Cys	Val	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Asn	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg
			20					25					30		
Lys	Glu	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Gln	Asn	Leu	Asn	His
		35					40					45			
Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu
	50					55				60					
Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Gln	Lys	Gly	Asp	Ile	Ala
65					70					75					80
Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr
				85				90					95		
Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Lys	Asn	Pro	Thr	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu
		115					120					125			
Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val
						135						140			
Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu
145					150					155					160
Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp
				165					170					175	
Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln
		180						185					190		
Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His
	210					215					220				
Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp
225					230					235					240
Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala
				245					250					255	
Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly
			260				265						270		
Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
	290					295					300				
Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly										
305					310										

<210> 14

5 <211> 602

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> C4beta (S188C)-P2A-C4alfa (T177C)

<400> 14

Met	Ser	Asn	Gln	Val	Leu	Cys	Cys	Val	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Asn	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg
			20					25					30		
Lys	Glu	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Gln	Asn	Leu	Asn	His
		35					40					45			
Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu
	50					55					60				
Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Gln	Lys	Gly	Asp	Ile	Ala
65					70					75					80
Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr
				85					90					95	
Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Lys	Asn	Pro	Thr	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu
		115					120					125			
Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val
	130					135						140			
Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu
145					150					155					160
Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp
				165					170					175	
Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln
		180						185					190		
Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His
	210					215					220				
Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp
225					230				235						240
Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala
				245					250					255	
Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly
			260				265						270		
Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
	290					295					300				
Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu
305					310				315						320
Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Thr	Ser	Ile
				325					330					335	
Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp	Leu	Val	Asn	Gly
			340					345					350		
Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val	Gln	Glu	Gly	Asp
		355					360					365			
Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asn	Tyr	Phe

370		375		380
Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln Leu Ile Ile Asp				
385		390		395
Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg Ile Ala Val Thr				400
		405		410
Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile Thr Glu Thr Gln				415
		420		425
Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr Glu Asp Tyr Gln				430
		435		440
Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln				445
		450		455
Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp				460
465		470		475
Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser				480
		485		490
Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp				495
		500		505
Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn				510
		515		520
Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro				525
		530		535
Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu				540
545		550		555
Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu				560
		565		570
Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn				575
		580		585
Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser				590
		595		600

<210> 15

<211> 602

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> C4beta (S188C)-P2A-C4alfa-DLT (T177C)

10

<400> 15

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

Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His
		210				215					220				
Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp
225					230					235					240
Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala
				245					250					255	
Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly
			260					265					270		
Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
		290				295					300				
Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu
305					310				315						320
Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Thr	Ser	Ile
				325					330					335	
Arg	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu	Asp	Leu	Val	Asn	Gly
			340					345					350		
Glu	Asn	Val	Glu	Gln	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Val	Gln	Glu	Gly	Asp
		355					360					365			
Ser	Ala	Val	Ile	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asn	Tyr	Phe
		370				375					380				
Pro	Trp	Tyr	Lys	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Arg	Pro	Gln	Leu	Ile	Ile	Asp
385					390					395					400
Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg	Ile	Ala	Val	Thr
				405					410					415	
Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile	Thr	Glu	Thr	Gln
				420				425					430		
Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr	Glu	Asp	Leu	Thr
		435					440					445			
Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Ile	Gln
		450				455					460				
Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp
465					470					475					480
Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser
				485					490					495	
Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val	Leu	Asp
			500					505					510		
Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn
		515					520					525			
Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro
		530				535					540				
Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu
545					550					555					560
Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu
				565					570					575	
Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	
			580					585				590			
Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser						
		595					600								

<210> 16

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno peptídico de WT-1

10

<400> 16

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

5 <210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido 2A de teschovirus porcino 1 (P2A)

<400> 17

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Glu Asn Pro Gly Pro
15 20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido 2A de virus *Thoseaasigna* (T2A)

25 <400> 18

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
1 5 10 15
Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 19
30 <211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> péptido 2A de virus A de rinitis equina (VARE) (E2A)

<400> 19

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15
Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

40 <210> 20
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido 2A de virus de enfermedad de pie y boca (F2A)

<400> 20

50 Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15
Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 21

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

5 <220>
<223> dominio variable de cadena C4(P1-CDR3)alfa

<400> 21

```
Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
 1          5          10          15
Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
          20          25          30
Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
          35          40          45
Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
 50          55          60
Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
65          70          75          80
Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
          85          90          95
Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Ser
          100          105          110
Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr
          115          120          125
Lys Leu Ile Ile Lys Pro
10          130
```

<210> 22
<211> 133
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de cadena C4(P18-CDR3)alfa

20 <400> 22

```
Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
 1          5          10          15
Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
          20          25          30
Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
          35          40          45
Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
 50          55          60
Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
65          70          75          80
Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
          85          90          95
Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ile Pro
          100          105          110
Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys
          115          120          125
Leu Ile Ile Lys Pro
          130
```

<210> 23
25 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de C4alfa

<400> 23

Asp Ser Ala Ser Asn Tyr

5 1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de C4alfa

15 <400> 24

Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu

 1 5

<210> 25

20 <211> 11

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CDR3 de C4alfa (DYQ)

<400> 25

Cys Ala Ala Thr Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp

 1 5 10

30 <210> 26

 <211> 11

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

35 <220>

 <223> CDR3 de C4alfa (DLT)

<400> 26

40 <210> 27

 <211> 5

45 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> CDR1 de C4beta

<400> 27

Leu Asn His Asp Ala

 1 5

55 <210> 28

 <211> 6

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CD2 de C4beta

<400> 28

Ser Gln Ile Val Asn Asp

5 1 5

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de C4beta

15 <400> 29

Cys Ala Ser Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe

 1 5 10

<210> 30

20 <211> 7

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CDR1 de P1alfa

<400> 30

Thr Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr

 1 5

30 <210> 31

 <211> 7

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

35 <220>

 <223> CDR2 de P1alfa

<400> 31

40 <210> 32

 <211> 16

45 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> CDR3 de P1alfa

<400> 32

Cys Ala Leu Ser Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp

 1 5 10 15

55 <210> 33

 <211> 5

 <212> PRT

 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CDR1 de P1beta
 <400> 33
Leu Gly His Asn Ala
 5 1 5
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD2 de P1beta
 15 <400> 34
Tyr Asn Phe Lys Glu Gln
 1 5
 <210> 35
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> CDR3 de P1beta
 <400> 35
Cys Ala Ser Ser Gln Asp Glu Gln Phe Leu Tyr Asn Glu Gln Phe
 1 5 10 15
 30 <210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR1 de P15alfa
 <400> 36
 40 **Asn Thr Ala Phe Asp Tyr**
 1 5
 <210> 37
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de P15alfa
 50 <400> 37
Ile Arg Pro Asp Val Ser Glu
 1 5
 55 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

<223> CDR3 de P15alfa

<400> 38

Cys Ala Ala Ser Pro Gln Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe

5 1 5 10 15

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de P15beta

15 <400> 39

Ser Glu His Asn Arg

1 5

<210> 40

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CD2 de P15beta

<400> 40

Phe Gln Asn Glu Ala Gln

1 5

30 <210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> CDR3 de P15beta

<400> 41

40 **Cys Ala Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Lys Asp Thr Gln Tyr Phe**

1 5 10

<210> 42

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de P18alfa

50 <400> 42

Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly

1 5

55 <210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CDR2 de P18alfa

<400> 43

Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln

5 1 5

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de P18alfa

15 <400> 44

Cys Ala Ile Pro Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp

 1 5 10 15

<210> 45

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CDR1 de P18beta

<400> 45

Ser Gly His Asp Tyr

 1 5

30 <210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> CD2 de P18beta

<400> 46

40 <210> 47

Phe Asn Asn Asn Val Pro

 1 5

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de P18beta

50 <400> 47

Cys Ala Ser Ser Val Ser Gly Ser Glu Ala Phe

 1 5 10

55 <210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CDR1 de (P20, P22)alfa
 <400> 48

Asp Arg Gly Ser Gln Ser
 5 1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de (P20, P22)alfa

15 <400> 49

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
 1 5

<210> 50
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> CDR3 de P20alfa

<400> 50

Cys Ala Val Leu Glu Gly Gln Lys Leu Leu Phe
 1 5 10

30 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR3 de P22alfa

<400> 51

40 **Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe**
 1 5 10

<210> 52
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 de (P20, P22)beta

50 <400> 52

Met Asp His Glu Asn
 1 5

55 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CD2 de (P20, P22)beta

<400> 53

Ser Tyr Asp Val Lys Met

5 1 5
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de P20beta

15 <400> 54

Cys Ala Thr Ser His Gln Pro Gln His Phe
 1 5 10

20 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR3 de P22beta

<400> 55

Cys Ala Ser Ser Ser Ile Asn Glu Gln Phe
 1 5 10

30 <210> 56
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> dominio variable de cadena P1alfa

<400> 56

40 **Met Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val**
 1 5 10 15
Val Ser Ser Met Ala Gln Lys Val Thr Gln Ala Gln Thr Glu Ile Ser
 20 25 30
Val Val Glu Lys Glu Asp Val Thr Leu Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg
 35 40 45
Asp Thr Thr Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Gly Glu
 50 55 60
Leu Val Phe Leu Ile Arg Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln Asn Glu Ile
 65 70 75 80
Ser Gly Arg Tyr Ser Trp Asn Phe Gln Lys Ser Thr Ser Ser Phe Asn
 85 90 95
Phe Thr Ile Thr Ala Ser Gln Val Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
Ala Leu Ser Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly
 115 120 125
Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro
 130 135

<210> 57
 <211> 142

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> dominio variable de cadena P15alfa

<400> 57

```

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

```

10

<210> 58
<211> 136
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> dominio variable de cadena P18alfa

<400> 58

20

```

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

```

<210> 59
<211> 131
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> dominio variable de cadena P20alfa

<400> 59

```

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1      5      10      15
Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro
 20      25      30
Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
 35      40      45
Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys
 50      55      60
Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp
 65      70      75      80
Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu
 85      90      95
Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
 100      105      110
Val Leu Glu Gly Gln Lys Leu Leu Phe Ala Arg Gly Thr Met Leu Lys
 115      120      125
Val Asp Leu
 130

```

5

<210> 60

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> dominio variable de cadena P22alfa

<400> 60

15

```

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1      5      10      15
Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro
 20      25      30
Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
 35      40      45
Asp Arg Val Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys
 50      55      60
Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp
 65      70      75      80
Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu
 85      90      95
Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
 100      105      110
Ala Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115      120      125
Met Val Lys Pro
 130

```

<210> 61

<211> 141

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio constante de cadena (P15, P20)alfa

25

<400> 61

```

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

```

<210> 62
 <211> 141
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena (P15, P20)alfa

<400> 62

```

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

```

15 <210> 63
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> dominio constante de cadena P22alfa

<400> 63

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

<210> 64

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio constante (T180C) de cadena P22alfa

<400> 64

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

15 <210> 65

<211> 134

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> dominio variable de cadena P1beta

<400> 65

25

Met	Gly	Cys	Arg	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Val	Pro	Met	Glu	Thr	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Arg	His	Leu	Val	Met
			20					25					30		
Gly	Met	Thr	Asn	Lys	Lys	Ser	Leu	Lys	Cys	Glu	Gln	His	Leu	Gly	His
			35				40					45			
Asn	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Lys	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Pro	Leu	Glu	Leu
						55					60				
Met	Phe	Val	Tyr	Asn	Phe	Lys	Glu	Gln	Thr	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Pro
65					70				75					80	
Ser	Arg	Phe	Ser	Pro	Glu	Cys	Pro	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Phe	Leu	His
				85				90						95	
Leu	His	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
			100				105						110		
Ser	Gln	Asp	Glu	Gln	Phe	Leu	Tyr	Asn	Glu	Gln	Phe	Phe	Gly	Pro	Gly
		115					120					125			
Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu										
		130													

<210> 66

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena P15beta

10

<400> 66

Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Asp	His	Ala	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Arg	His	Lys	Ile	Thr
			20					25					30		
Lys	Arg	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Phe	Arg	Cys	Asp	Pro	Ile	Ser	Glu	His
			35				40					45			
Asn	Arg	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu	Phe
						55					60				
Leu	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Glu	Ala	Gln	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Leu	Leu
65					70				75					80	
Ser	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys	Gly	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu
				85				90						95	
Glu	Ile	Gln	Arg	Thr	Glu	Gln	Gly	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala
			100				105						110		
Ser	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Lys	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr
		115					120					125			
Arg	Leu	Thr	Val	Leu											
		130													

15 <210> 67

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> dominio variable de cadena P18beta

<400> 67

```

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala
 1           5           10           15
Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr
          20           25           30
Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His
          35           40           45
Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu
          50           55           60
Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro
65          70           75           80
Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu
          85           90           95
Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
          100          105          110
Ser Ser Val Ser Gly Ser Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
          115          120          125
Thr Val Val
          130

```

<210> 68
 <211> 128
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena P20beta

<400> 68

```

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

```

15 <210> 69
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> dominio variable de cadena P22beta

<400> 69

```

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val

```

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

Leu

<210> 70

<211> 177

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio constante de cadena (P18, P20)beta

10

<400> 70

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

Phe

15 <210> 71

<211> 177

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> cadena (P18, P20)beta

<400> 71

Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro		
1				5					10					15			

25

ES 2 841 274 T3

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

Phe

<210> 72

<211> 613

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> P1alfa (T185C)-P2A-P1beta

<400> 72

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

				245				250				255				
Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	
				260				265				270				
Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	
				275				280				285				
Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Cys	Arg	
				290				295				300				
Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Met	Glu	
305					310				315				320			
Thr	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Arg	His	Leu	Val	Met	Gly	Met	Thr	Asn	
				325				330				335				
Lys	Lys	Ser	Leu	Lys	Cys	Glu	Gln	His	Leu	Gly	His	Asn	Ala	Met	Tyr	
				340				345				350				
Trp	Tyr	Lys	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Pro	Leu	Glu	Leu	Met	Phe	Val	Tyr	
				355				360				365				
Asn	Phe	Lys	Glu	Gln	Thr	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	
				370				375				380				
Pro	Glu	Cys	Pro	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Phe	Leu	His	Leu	His	Thr	Leu	
385					390				395				400			
Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu	
				405				410				415				
Gln	Phe	Leu	Tyr	Asn	Glu	Gln	Phe	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	
				420				425				430				
Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	
				435				440				445				
Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	
				450				455				460				
Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	
465					470				475				480			
Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	
				485				490				495				
Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	
				500				505				510				
Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	
				515				520				525				
Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	
				530				535				540				
Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	
545					550				555				560			
Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	
				565				570				575				
Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	
				580				585				590				
Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	
				595				600				605				
Lys	Asp	Ser	Arg	Gly												
				610												

<210> 73
<211> 617
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P15alfa (T190C)-P2A-P15beta (S190C)

<400> 73

ES 2 841 274 T3

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

Ile	Asn	Cys	Ala	Tyr	Glu	Asn	Thr	Ala	Phe	Asp	Tyr	Phe	Pro	Trp	Tyr
50						55					60				
Gln	Gln	Phe	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Ile	Ala	Ile	Arg	Pro
65					70					75					80
Asp	Val	Ser	Glu	Lys	Lys	Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Phe	Asn	Lys
				85					90					95	
Ser	Ala	Lys	Gln	Phe	Ser	Leu	His	Ile	Met	Asp	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp
			100					105					110		
Ser	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Gln	Gly	Ala	Gly	Ser	Tyr
		115					120					125			
Gln	Leu	Thr	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Pro	Asn	Ile
	130					135						140			
Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser
145					150					155					160
Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val
				165					170					175	
Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val	Leu
			180					185					190		
Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser
	195						200					205			
Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile
	210					215					220				
Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys
225					230					235					240
Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn
				245					250					255	
Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe
			260					265					270		
Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr
	275						280					285			
Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly
	290					295					300				
Pro	Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly
305					310					315					320
Ala	Asp	His	Ala	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Arg	His	Lys	Ile
				325					330					335	
Thr	Lys	Arg	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Phe	Arg	Cys	Asp	Pro	Ile	Ser	Glu
			340					345					350		
His	Asn	Arg	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu
	355						360					365			
Phe	Leu	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Glu	Ala	Gln	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Leu
	370					375					380				
Leu	Ser	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys	Gly	Ser	Phe	Ser	Thr
385					390					395					400
Leu	Glu	Ile	Gln	Arg	Thr	Glu	Gln	Gly	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Leu	Cys
				405					410					415	
Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Lys	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly
			420					425					430		
Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu
			435				440					445			
Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys
	450					455					460				
Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu
465					470					475					480
Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr
				485					490					495	
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr
			500					505					510		
Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro
	515						520					525			
Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn
	530					535					540				
Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser

ES 2 841 274 T3

545					550					555					560
Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr
				565					570					575	
Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly
			580					585					590		
Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala
		595					600					605			
Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly							
	610					615									

<210> 74

<211> 607

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P18alfa (T184C)-P2A-P18beta (S188C)

10

<400> 74

Met	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Val	Thr	Ala	Ser	Leu	Trp	Leu
1				5					10					15	
Gly	Pro	Gly	Ile	Ala	Gln	Lys	Ile	Thr	Gln	Thr	Gln	Pro	Gly	Met	Phe
			20					25					30		
Val	Gln	Glu	Lys	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Asp	Cys	Thr	Tyr	Asp	Thr	Ser
		35					40					45			
Asp	Gln	Ser	Tyr	Gly	Leu	Phe	Trp	Tyr	Lys	Gln	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu
	50					55					60				
Met	Ile	Phe	Leu	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Tyr	Asp	Glu	Gln	Asn	Ala	Thr
65					70					75					80
Glu	Gly	Arg	Tyr	Ser	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Asn
				85				90						95	
Leu	Val	Ile	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys
			100					105					110		
Ala	Ile	Pro	Thr	Leu	Met	Asp	Ser	Asn	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala
		115				120						125			
Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala
	130					135					140				
Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu
145					150					155					160
Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser
				165				170						175	
Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp
			180					185					190		
Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala
		195					200					205			
Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe
	210					215				220					
Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe
225					230					235					240
Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe
				245				250						255	
Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu
		260						265					270		
Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys
		275					280					285			
Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ser	Trp	Thr
	290					295					300				
Leu	Cys	Cys	Val	Ser	Leu	Cys	Ile	Leu	Val	Ala	Lys	His	Thr	Asp	Ala
305					310					315					320
Gly	Val	Ile	Gln	Ser	Pro	Arg	His	Glu	Val	Thr	Glu	Met	Gly	Gln	Glu
				325				330						335	
Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Pro	Ile	Ser	Gly	His	Asp	Tyr	Leu	Phe	Trp
			340					345					350		

Tyr	Arg	Gln	Thr	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Asn
		355					360					365			
Asn	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Ser	Gly	Met	Pro	Glu	Asp	Arg	Phe	Ser
		370				375					380				
Ala	Lys	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu	Lys	Ile	Gln	Pro	Ser
385					390					395					400
Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser	Ser	Val	Ser	Gly
			405						410					415	
Ser	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu	Asp
			420					425					430		
Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu
		435					440					445			
Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr
		450				455					460				
Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys
465					470					475					480
Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln
				485					490					495	
Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val
			500					505					510		
Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val
		515				520						525			
Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala
		530				535					540				
Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp
545					550					555					560
Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr
				565					570					575	
Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu
			580					585					590		
Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Phe	
		595					600					605			

<210> 75
<211> 599
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P20alfa (T179C)-P2A-P20beta (S185C)

<400> 75

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

				165				170				175			
Asp	Lys	Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser
180								185				190			
Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe
195								200				205			
Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser
210				215				220							
Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn
225				230				235				240			
Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu
245								250				255			
Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser
260								265				270			
Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val
275								280				285			
Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala
290				295				300							
Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser
305				310				315				320			
Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys
325								330				335			
Val	Gln	Asp	Met	Asp	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro
340								345				350			
Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys
355				360				365							
Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys
370				375				380							
Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser
385				390				395				400			
Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Thr	Ser	His	Gln	Pro	Gln	His	Phe	Gly	Asp	Gly
405								410				415			
Thr	Arg	Leu	Ser	Ile	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu
420								425				430			
Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys
435								440				445			
Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu
450				455				460							
Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr
465				470				475				480			
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr
485								490				495			
Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro
500								505				510			
Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn
515								520				525			
Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser
530				535				540							
Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr
545				550				555				560			
Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly
565								570				575			
Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala
580								585				590			
Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Phe									
595															

<210> 76
<211> 603
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> P22alfa (T180C)-P2A-P22beta (S186C)

<400> 76

Met	Met	Lys	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Gln	Leu
1				5					10					15	
Ser	Trp	Val	Trp	Ser	Gln	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Gln	Asn	Ser	Gly	Pro
		20						25				30			
Leu	Ser	Val	Pro	Glu	Gly	Ala	Ile	Ala	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser
		35					40					45			
Asp	Arg	Val	Ser	Gln	Ser	Phe	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gly	Lys
	50					55					60				
Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Met	Ser	Ile	Tyr	Ser	Asn	Gly	Asp	Lys	Glu	Asp
65					70					75					80
Gly	Arg	Phe	Thr	Ala	Gln	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Gln	Tyr	Val	Ser	Leu
				85					90					95	
Leu	Ile	Arg	Asp	Ser	Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Leu	Cys	Ala
			100					105					110		
Ala	Asn	Asn	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu
		115					120					125			
Met	Val	Lys	Pro	His	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu
	130					135					140				
Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe
145					150					155					160
Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile
				165					170					175	
Thr	Asp	Lys	Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn
			180					185					190		
Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala
		195					200					205			
Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu
	210					215					220				
Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr
225					230					235					240
Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu
			245						250					255	
Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser
		260						265					270		
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp
		275					280					285			
Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val
	290					295					300				
Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln
305					310					315					320
Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu
				325					330					335	
Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp
			340					345					350		
Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met
		355					360					365			
Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys
	370					375					380				
Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr
385					390					395					400
Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Asn	Glu	Gln	Phe	Phe	Gly
				405					410					415	
Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro
			420					425					430		
Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr
		435					440					445			
Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His
	450					455					460				
Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val
465					470					475					480
Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser

				485					490					495			
Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln		
			500					505					510				
Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser		
		515					520					525					
Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile		
	530					535					540						
Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu		
545					550					555					560		
Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu		
				565					570					575			
Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu		
			580					585					590				
Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly							
		595					600										

<210> 77
 <211> 387
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena de C4alfa WT

<400> 77

atgacatcca	ttcgagctgt	atttatattc	ctgtggctgc	agctggactt	ggtgaatgga	60
gagaatgtgg	agcagcatcc	ttcaaccctg	agtgtccagg	agggagacag	cgctgttattc	120
aagtgtactt	attcagacag	tgcctcaaac	tacttccctt	ggtataagca	agaacttgga	180
aaaagacctc	agcttattat	agacattcgt	tcaaattgtg	gcgaaaagaa	agaccaacga	240
attgctgtta	cattgaacaa	gacagccaaa	catttctccc	tgcacatcac	agagacccaa	300
cctgaagact	cggtgtgcta	cttctgtgca	gcgaccgaag	actatcagtt	aatctggggc	360
gctggggacca	agctaattat	aaagcca				387

15 <210> 78
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> dominio variable de cadena C4alfa - con codones optimizados

<400> 78

atgaccagca	tccgggccgt	gttcatcttc	ctgtggctgc	agctggacct	cgtcaacggc	60
gagaacgtgg	aacagcatcc	cagcaccctg	agcgtgcagg	aaggcgacag	cgccgtcatc	120
aagtgcacct	acagcgactc	cgccagcaac	tacttccctt	ggtacaagca	ggaactgggc	180
aagcggcccc	agctgatcat	cgacatccgg	tccaacgtgg	gcgagaagaa	ggaccagcgg	240
atcgccgtga	ccctgaacaa	gaccgccaag	cacttcagcc	tgcacatcac	cgagacacag	300
cccaggagact	ccgccgtgta	cttctgtgcc	gccaccgagg	attaccagct	gatctgggga	360
gccggcacca	agctgatcat	taagccc				387

25 <210> 79
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena C4alfa-DLT

<400> 79

	atgacatcca	ttcgagctgt	atztatattc	ctgtggctgc	agctggactt	ggtgaatgga	60
	gagaatgtgg	agcagcatcc	ttcaaccctg	agtgtccagg	agggagacag	cgctgttattc	120
	aagtgtactt	attcagacag	tgcctcaaac	tacttccctt	ggtataagca	agaacttgga	180
	aaaagacctc	agcttattat	agacattcgt	tcaaagtgtg	gcgaaaagaa	agaccaacga	240
	attgctgtta	cattgaacaa	gacagccaaa	catttctccc	tgcacatcac	agagacccaa	300
	cctgaagact	cggtgtgcta	cttctgtgca	gcgaccgaag	acctgacgtt	aatctggggc	360
	gctgggacca	agctaattat	aaagcca				387
	<210> 80						
5	<211> 387						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
10	<223> dominio variable de cadena C4alfa-DLT, con codones optimizados						
	<400> 80						
	atgaccagca	tccgggccgt	gttcattcttc	ctgtggctgc	agctggacct	cgtcaacggc	60
	gagaacgtgg	aacagcacc	cagcaccctg	agcgtgcagg	aaggcgacag	cgccgtcatc	120
	aagtgcacct	acagcgactc	cgccagcaac	tacttcccct	ggtacaagca	ggaactgggc	180
	aagcggcccc	agctgatcat	cgacatccgg	tccaacgtgg	gcgagaagaa	ggaccagcgg	240
	atcgccgtga	ccctgaacaa	gaccgccaa	cacttcagcc	tgcacatcac	cgagacacag	300
	cccagaggact	ccgccgtgta	cttctgtgcc	gccaccgagg	atctgacgct	gatctgggga	360
	gccggcacca	agctgatcat	taagccc				387
15	<210> 81						
	<211> 426						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
20	<220>						
	<223> dominio constante de cadena C4alfa WT						
	<400> 81						
25	gatatccaga	accctgacct	tgccgtgtac	cagctgagag	actctaaatc	cagtgacaag	60
	tctgtctgcc	tattcaccga	ttttgattct	caaacaaatg	tgtcacaaag	taaggattct	120
	gatgtgtata	tcacagacaa	aactgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	caagagcaac	180
	agtgtgtgtg	cctggagcaa	caaactgtac	tttgcattgt	caaacgcctt	caacaacagc	240
	attattccag	aagacacctt	cttccccagc	ccagaaagtt	cctgtgatgt	caagctggtc	300
	gagaaaagct	ttgaaacaga	tacgaacctc	aactttcaaa	acctgtcagt	gattgggttc	360
	cgaatcctcc	tcctgaaagt	ggccgggttt	aatctgctca	tgacgctgcg	gctgtgggtc	420
	agctga						426
	<210> 82						
	<211> 426						
30	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> dominio constante de cadena C4alfa - con codones optimizados						
35	<400> 82						
	gacatccaga	accccgacct	tgccgtgtac	cagctgcggg	acagcaagag	cagcgacaag	60
	agcgtgtgcc	tggtcaccga	cttcgacagc	cagaccaacg	tgtcccagag	caaggacagc	120
	gacgtgtaca	tcaccgataa	gaccgtgctg	gacatgcgga	gcatggactt	caagagcaac	180
	agcggccgtg	cctggtccaa	caagagcgac	ttcgccctgc	ccaacgcctt	caacaacagc	240
	attatccccg	aggacacatt	cttcccaagc	cccagagagc	gctgcgacgt	gaagctgggtg	300
	gaaaagagct	tcgagacaga	caccaacctg	aacttcagaa	acctcagcgt	gatcggcttc	360
	cggatcctgc	tgctgaaggt	ggccggcttc	aacctgctga	tgaccctgcg	gctgtgggtc	420
	agctga						426

	<210> 83	
	<211> 426	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> dominio constante de cadena C4alfa - modificación con Cys	
10	<400> 83	
	gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60	
	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaag taaggattct 120	
	gatgtgtata tcacagacaa atgctgtgta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180	
	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac ttgtcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240	
	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc 300	
	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360	
	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgtctca tgacgctgcg gctgtggtcc 420	
	agctga 426	
	<210> 84	
15	<211> 426	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> dominio constante de cadena C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados	
	<400> 84	
	gacatccaga accccgaccc tgccgtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60	
	agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc 120	
	gacgtgtaca tcaccgataa gtgctgtctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180	
	agcgcctgtg cctggtccaa caagagcgac ttgcctgctg ccaacgcctt caacaacagc 240	
	attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg 300	
	gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcacga acctcagcgt gatcgggttc 360	
	cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgacctgctg gctgtggtcc 420	
	agctga 426	
25	<210> 85	
	<211> 813	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cadena C4alfa WT	
	<400> 85	
35	atgacatcca ttcgagctgt atttatatct ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga 60	
	gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttatc 120	
	aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga 180	
	aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaagtgtg gcgaaaagaa agaccaacga 240	
	attgtgtgta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300	
	cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcgaccgaag actatcagtt aatctggggc 360	
	gctgggacca agctaattat aaagccagat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag 420	
	ctgagagact ctaaatccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa 480	
	acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac 540	
	atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt 600	
	gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca 660	
	gaaagttcct gtgatgtcaa gctggtcgag aaaagctttg aaacagatac gaacctaaac 720	
	tttcaaaacc tgtcagtgat tgggttccga atcctcctcc tgaaagtggc cgggtttaat 780	
	ctgctcatga cgctgcggct gtggtccagc tga 813	

	<210> 86	
	<211> 813	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cadena C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados	
10	<400> 86	
	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc 60	
	gagaacgtgg aacagcacc cagcaccctg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc 120	
	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttccccct ggtacaagca ggaactgggc 180	
	aagcggcccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg 240	
	atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag 300	
	cccaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg actaccagct gatctgggga 360	
	gccggcacca agctgatcat taagcccgc atccagaacc ccgaccctgc cgtgtaccag 420	
	ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag 480	
	accaacgtgt cccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca ccgataagtg cgtgctggac 540	
	atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa gagcgacttc 600	
	gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg acacattctt cccaagcccc 660	
	gagagcagct gcgacgtgaa gctggtggaa aagagcttcg agacagacac caacctgaac 720	
	ttccagaacc tcagcgtgat cggcttccgg atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaac 780	
	ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc tga 813	
	<210> 87	
15	<211> 813	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cadena C4alfa-DLT - modificación con Cys, con codones optimizados	
	<400> 87	
	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc 60	
	gagaacgtgg aacagcacc cagcaccctg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc 120	
	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttccccct ggtacaagca ggaactgggc 180	
	aagcggcccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg 240	
	atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag 300	
	cccaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg atctgacgct gatctgggga 360	
	gccggcacca agctgatcat taagcccgc atccagaacc ccgaccctgc cgtgtaccag 420	
	ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag 480	
	accaacgtgt cccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca ccgataagtg cgtgctggac 540	
	atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa gagcgacttc 600	
	gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg acacattctt cccaagcccc 660	
	gagagcagct gcgacgtgaa gctggtggaa aagagcttcg agacagacac caacctgaac 720	
	ttccagaacc tcagcgtgat cggcttccgg atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaac 780	
	ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc tga 813	
25	<210> 88	
	<211> 393	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> dominio variable de cadena C4beta WT	
35	<400> 88	

	atgagcaacc aggtgctctg ctgtgtggtc ctttgtttcc tgggagcaaa caccgtggat	60
	ggtggaatca ctcagtcctc aaagtacctg ttcagaaagg aaggacagaa tgtgaccctg	120
	agttgtgaac agaatttgaa ccacgatgcc atgtactggt accgacagga cccagggcaa	180
	gggctgagat tgatctacta ctcacagata gtaaataact ttcagaaagg agatataact	240
	gaagggtaca gcgtctctcg ggagaagaag gaatcctttc ctctcactgt gacatcggcc	300
	caaaagaacc cgacagcttt ctatctctgt gccagtagcc ccggggccct ctacgagcag	360
	tacttcgggc cgggcaccag gctcacggtc aca	393
	<210> 89	
	<211> 393	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> dominio variable de cadena C4beta - con codones optimizados	
	<400> 89	
	atgagcaacc aggtgctgtg ctgcgtggtg ctgtgttctc tgggcgcaa caccgtggac	60
	ggcggcatca cccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg	120
	agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgacag	180
	ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaaggg agatatactc	240
	gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgcc	300
	cagaagaacc ccaccgcctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag	360
	tacttcgggc ctggcaccgc gctgacagtg acc	393
15	<210> 90	
	<211> 540	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta WT	
	<400> 90	
	gaggacctga aaaacgtgtt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag	60
	atctcccaca cccaaaaggc cactactggtg tgcctggcca caggcttcta ccccgaccac	120
	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagaccgc	180
	cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg	240
	agggctctcg ccaccttctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc	300
	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaacctgt caccagatc	360
	gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa	420
	ggggctcctgt ctgccaccat cctctatgag atcttgctag ggaaggccac cttgtatgcc	480
25	gtgctgggtca gtgccctcgt gctgatggcc atggtcaaga gaaaggattc cagaggctag	540
	<210> 91	
	<211> 540	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta - modificación con Cys	
35	<400> 91	

gaggacctga	aaaacgtgtt	cccacccgag	gtcgctgtgt	ttgagccatc	agaagcagag	60
atctcccaca	cccaaaaggc	cacactgggtg	tgcctggcca	caggcttcta	ccccgaccac	120
gtggagctga	gctggtgggt	gaatgggaag	gaggtgcaca	gtgggggtcag	cacagacccg	180
cagcccctca	aggagcagcc	cgccctcaat	gactccagat	actgcctgag	cagccgcctg	240
agggtctcgg	ccaccttctg	gcagaacccc	cgcaaccact	tccgctgtca	agtccagttc	300
tacgggctct	cggagaatga	cgagtggacc	caggataggg	ccaaacctgt	caccagatc	360
gtcagcgccg	aggcctgggg	tagagcagac	tgtggcttca	cctccgagtc	ttaccagcaa	420
ggggctctgt	ctgccaccat	cctctatgag	atcttgctag	ggaaggccac	cttgtagtgc	480
gtgctggtca	gtgccctcgt	gctgatggcc	atggtcaaga	gaaaggattc	cagaggctag	540

$\langle 211 \rangle$ 540

<213> Secuencia artificial

<223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta - con codones optimizados

<400> 92

gaggacctga	agaacgtgtt	ccccccagag	gtggccgtgt	tccagcctag	cgaggccgag	60
atcagccaca	cccagaaagc	caccctcgtg	tgcctggcca	cgggctttta	ccccgaccac	120
gtggaactgt	cttgggtggg	caacggcaaa	gaggtgcaca	gcggcgtcag	caccgacccc	180
cagcccctga	aagagcagcc	cgccctgaac	gacagccggt	actgtctgag	cagcagactg	240
agagtgtccg	ccaccttctg	gcagaacccc	cgggaaccact	tcagatgcc	ggtgcagttc	300
tacggcctga	gcgagaacga	cgagtggacc	caggaccggg	ccaagcccgt	gaccagatc	360
gtgtctgctg	aggcctgggg	cagagccgat	tgcggcttca	ccagcgagag	ctaccagcag	420
ggcgtgctga	gcgccaccat	cctgtacgag	atcctgctgg	gcaaggccac	cctgtacgcc	480
gtgctggtgt	ccgccctggt	gctgatggcc	atggtcaagc	ggaaggacag	ccggggctga	540

<211> 540

<213> Secuencia artificial

<223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 93

gaggacctga	agaacgtgtt	ccccccagag	gtggccgtgt	tcgagcctag	cgaggccgag	60
atcagccaca	cccagaaagc	caccctcgtg	tgccctggcca	ccggctttta	ccccgaccac	120
gtggaactgt	cttgggtgggt	caacggcaaa	gaggtgcaca	gcgggcgtctg	caccgacccc	180
cagcccctga	aagagcagcc	cgccctgaac	gacagccggt	actgtctgag	cagcagactg	240
agagtgtccg	ccaccttctg	gcagaacccc	cgggaaccact	tcagatgccca	ggtgcagttc	300
tacggcctga	gcgagaacga	cgagtggacc	caggaccggg	ccaagcccgt	gaccagatc	360
gtgtctgctg	aggcctgggg	cagagccgat	tgcggttca	ccagcgagag	ctaccagcag	420
ggcgtgctga	gcgccaccat	cctgtacgag	atcctgctgg	gcaaggccac	cctgtacgcc	480
gtgctggtgt	ccgccctggt	gctgatggcc	atggtcaagc	ggaaggacag	ccggggctga	540

<211> 933

<213> Secuencia artificial

<223> cadena C4beta WT

<400> 94

atgagcaacc	aggtgctctg	ctgtgtggtc	ctttgtttcc	tgggagcaaa	caccgtggat	60
ggtggaatca	ctcagtcctc	aaagtacctg	ttcagaaagg	aaggacagaa	tgtgaccctg	120
agttgtgaac	agaatttgaa	ccacgatgcc	atgtactggg	accgacagga	cccagggcaa	180
gggctgagat	tgatctacta	ctcacagata	gtaaatgact	ttcagaaagg	agatatagct	240
gaagggtaca	gcgtctctcg	ggagaagaag	gaatcctttc	ctctcactgt	gacatcggcc	300
caaaagaacc	cgacagcttt	ctatctctgt	gccagtagcc	ccggggccct	ctacgagcag	360
tacttcgggc	cgggcaccag	gctcacggtc	acagaggacc	tgaaaaacgt	gttcccaccc	420
gagggtcgctg	tgtttgagcc	atcagaagca	gagatctccc	acacccaaaa	ggccacactg	480
gtgtgcctgg	ccacaggctt	ctaccccgc	cacgtggagc	tgagctgggtg	ggtgaatggg	540
aaggaggtgc	acagtggggg	cagcacagac	ccgcagcccc	tcaaggagca	gcccgccttc	600
aatgactcca	gatactgcct	gagcagccgc	ctgaggggtc	cggccacctt	ctggcagaac	660
ccccgcaacc	acttccgctg	tcaagtccag	ttctacgggc	tctcggagaa	tgacgagtgg	720
acccaggata	gggcaaaacc	tgtcaccag	atcgtcagcg	ccgaggcctg	gggtagagca	780
gactgtggct	tcacctccga	gtcttaccag	caaggggtcc	tgtctgccac	catcctctat	840
gagatccttg	tagggaaggc	cacctgtgat	gccgtgctgg	tcagtgcctt	cgtgctgatg	900
gccatggtca	agagaaagga	ttccagaggc	tag			933

<210> 95

<211> 933

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena C4beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10

<400> 95

atgagcaacc	aggtgctgtg	ctgcgtggtg	ctgtgtttcc	tgggcgccaa	caccgtggac	60
ggcggcatca	cccagagccc	caagtacctg	ttccggaag	agggccagaa	cgtcaccttg	120
agctgcgagc	agaacctgaa	ccacgacgcc	atgtactggg	acagacagga	ccccggacag	180
ggcctgcggc	tgatctacta	cagccagatc	gtgaacgact	tccagaaggg	agatatcgcc	240
gaggggtaca	gcgtgtccag	agagaagaaa	gagtccttcc	cactgaccgt	gaccagcgcc	300
cagaagaacc	ccaccgcctt	ctacctgtgc	gccagctctc	ctggcgccct	gtacgagcag	360
tacttcggcc	ctggcaccgc	gctgacagtg	accgaggacc	tgaagaacgt	gttcccccca	420
gagggtggccg	tgttcgagcc	tagcgaggcc	gagatcagcc	acaccagaa	agccaccctc	480
gtgtgcctgg	ccaccggctt	ttaccccgc	cacgtggaac	tgtcttgggtg	ggtcaacggc	540
aaagaggtgc	acagcggcgt	ctgcaccgac	ccccagcccc	tgaagagca	gcccgccttg	600
aacgacagcc	ggtactgtct	gagcagcaga	ctgagagtgt	ccgccacctt	ctggcagaac	660
ccccggaacc	acttcagatg	ccagggtgcag	ttctacggcc	tgagcgagaa	cgacgagtgg	720
acccaggacc	gggccaagcc	cgtgaccag	atcgtgtctg	ctgaggcctg	gggcagagcc	780
gattgcggct	tcaccagcga	gagctaccag	cagggcgtgc	tgagcgccac	catcctgtac	840
gagatcctgc	tgggcaaggc	caccctgtac	gccgtgctgg	tgtccgccct	ggtgctgatg	900
gccatggtca	agcggaagga	cagccggggc	tga			933

15 <210> 96

<211> 1809

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> constructo C4beta-P2A-C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 96

```

atgagcaacc aggtgctgtg ctgctgtgtg ctgtgtttcc tgggcgcca caccgtggac 60
ggcggcatca cccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg 120
agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggg acagacagga ccccgagacg 180
ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaaggg agatatcgcc 240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgcc 300
cagaagaacc ccaccgcctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag 360
tacttcggcc ctggcaccgg gctgacagtg accgaggacc tgaagaacgt gttcccccca 420
gaggtggccg tggttcgagcc tagcgaggcc gagatcagcc acaccagaa agccaccctc 480
gtgtgcctgg ccaccggctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttgggtg ggtcaacggc 540
aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac cccagagccc tgaaagagca gcccgccttg 600
aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac 660
ccccggaacc acctcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacagtggt 720
acccaggacc gggccaagcc cgtgaccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc 780
gattgcccgt tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840
gagatcctgc tgggcaaggg caccctgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg 900
gccatggtca agcggaagga cagccggggc ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta 960
aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc ggtcccatga ccagcatccg ggccgtgttc 1020
atcttcctgt ggctgcagct ggacctcgtc aacggcgaga acgtggaaca gcacccagc 1080
accctgagcg tgcaggaagg cgacagcgcc gtcatcaagt gcacctacag cgactccgcc 1140
agcaactact tcccctggta caagcaggaa ctgggcaagc ggccccagct gatcatcgac 1200
atccggtcca acgtgggcga gaagaaggac cagcggatcg ccgtgaccct gaacaagacc 1260
gccaagcact tcagcctgca catcaccgag acacagcccg aggactccgc cgtgtacttc 1320
tgtgccgcca ccgaggacta ccagctgatc tggggagccg gcaccaagct gatcattaag 1380
cccagacatc agaaccccga ccctgccgtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac 1440
aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac 1500
agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc 1560
aacagcgccg tggcctgggt caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac 1620
agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg 1680
gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcgcc 1740
ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg 1800
tccagctga 1809

```

<210> 97

<211> 1809

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> constructo C4beta-P2A-C4alfa-DLT - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 97

```

atgagcaacc aggtgctgtg ctgctgtgtg ctgtgtttcc tgggcgcca caccgtggac 60
ggcggcatca cccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg 120
agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgagacag 180
ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaaggg agatatcgcc 240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgcc 300
cagaagaacc ccaccgcctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag 360
tacttcggcc ctggcaccgg gctgacagtg accgaggacc tgaagaacgt gttcccccca 420
gaggtggccg tggttcgagcc tagcagggcc gagatcagcc acaccagaa agccaccctc 480
gtgtgcctgg ccaccggctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540
aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac cccagcccc tgaaagagca gcccgcctg 600
aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac 660
ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg 720
accagagacc ggccaagcc cgtgaccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc 780
gattgcggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840
gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg 900
gccatggtca agcggaaagg cagccggggc ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta 960
aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc ggtcccatga ccagcatccg ggccgtgttc 1020
atcttctgtt ggctgcagct ggacctcgtc aacggcgaga acgtggaaca gcacccagc 1080
accctgagcg tgcaggaagg cgacagcgcc gtcatcaagt gcacctacag cgactccgcc 1140
agcaactact tcccctggtt caagcaggaa ctgggcaagc ggccccagct gatcatcgac 1200
atccggtcca acgtgggcga gaagaaggac cagcggatcg ccgtgacctt gaacaagacc 1260
gccaagcact tcagcctgca catcaccgag acacagcccc aggactccgc cgtgtacttc 1320
tgtgccgcca ccgaggatct gacgctgatc tggggagccg gcaccaagct gatcattaag 1380
cccagacatcc agaaccccga ccctgccgtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac 1440
aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac 1500
agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc 1560
aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac 1620
agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg 1680
gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc 1740
ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgacctt gcggctgtgg 1800
tccagctga 1809

```

<210> 98

<211> 66

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido 2A de teschovirus porcino 1 (P2A)

<400> 98

```

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60
ggacct 66

```

15 <210> 99

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido 2A de teschovirus porcino 1 (P2A) - con codones optimizados

<400> 99

```

ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc 60
ggtccc 66

```

<210> 100

<211> 63

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> péptido 2A de virus <i>Thoseaasigna</i> (T2A)		
	<400> 100		
5			
	ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga	60	
	cct	63	
	<210> 101		
	<211> 69		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> péptido 2A de virus A de rinitis equina (VARE) 2A (E2A) péptido		
15			
	<400> 101		
	ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac	60	
	cctggacct	69	
20	<210> 102		
	<211> 75		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> péptido 2A de virus de enfermedad de pie y boca (F2A)		
	<400> 102		
30	ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag	60	
	tccaaccctg gacct	75	
	<210> 103		
	<211> 411		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> dominio variable de cadena P1alfa		
40	<400> 103		
	atgctgactg ccagcctgtt gagggcagtc atagcctcca tctgtgttgt atccagcatg	60	
	gctcagaagg taactcaagc gcagactgaa atttctgttg tggagaagga ggatgtgacc	120	
	ttggactgtg tgtatgaaac ccgtgatact acttattact tattctggta caagcaacca	180	
	ccaagtggag aattggtttt ccttattcgt cggaactctt ttgatgagca aaatgaaata	240	
	agtggtcggt attccttgaa cttccagaaa tccaccagtt ccttcaactt caccatcaca	300	
	gcctcacaag tcgtggactc agcagtatac ttctgtgctc tgagtgaggc gcatagggat	360	
	agcaactatc agttaatctg gggcgctggg accaagctaa ttataaagcc a	411	
	<210> 104		
45	<211> 426		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> dominio variable de cadena P15alfa		
	<400> 104		
	atggacaaga tcttaggagc atcatTTTTT gttctgtggc ttcaactatg ctgggtgagt	60	

	ggccaacaga	aggagaaaaag	tgaccagcag	cagggtgaaac	aaagtccctca	atcttttgata	120
	gtccagaaaag	gagggatttc	aattataaac	tgtgcttatg	agaacactgc	gtttgactac	180
	tttccatggt	accaacaatt	ccctgggaaa	ggccctgcat	tattgatagc	catacgtcca	240
	gatgtgagtg	aaaagaaaag	aggaagattc	acaatctcct	tcaataaaaag	tgccaagcag	300
	ttctcattgc	atatcatgga	ttcccagcct	ggagactcag	ccacctactt	ctgtgcagca	360
	agcccccagg	gggctgggag	ttaccaactc	actttcggga	aggggaccaa	actctcggtc	420
	atacca						426
	<210> 105						
	<211> 408						
5	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> dominio variable de cadena P18alfa						
10	<400> 105						
	atgtcacttt	ctagcctgct	gaaggtggct	acagcttcac	tgtggctagg	acctggcatt	60
	gccagaaga	taactcaaac	ccaaccagga	atgttcgtgc	aggaaaagga	ggctgtgact	120
	ctggactgca	catatgacac	cagtgatcaa	agttatggct	tattctggta	caagcagccc	180
	agcagtgggg	aaatgatttt	tcttatttat	caggggtctt	atgacgagca	aaatgaaca	240
	gaaggtcgct	actcattgaa	ttccagaag	gcaagaaaat	ccgccaacct	tgtcatctcc	300
	gcttcacaac	tgggggactc	agcaatgtat	ttctgtgcaa	tcccgactct	catggatagc	360
	aactatcagt	taatctgggg	cgctgggacc	aagctaatta	taaagcca		408
15	<210> 106						
	<211> 393						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> dominio variable de cadena P20alfa						
20	<400> 106						
	atgatgaaat	ccttgagagt	tttactagtg	atcctgtggc	ttcagttgag	ctggggtttgg	60
	agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggacccctca	gtgttccaga	gggagccatt	120
	gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	ggttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
	tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatggtga	caaagaagat	240
	ggaaggttta	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
	tcccagccca	gtgattcagc	cacctacctc	tgtgccgtgt	tagaaggcca	gaagctgctc	360
25	tttgcaaggg	ggaccatgtt	aaaggtggat	ctt			393
	<210> 107						
	<211> 396						
	<212> ADN						
30	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> dominio variable de cadena P22alfa						
35	<400> 107						
	atgatgaaat	ccttgagagt	tttactagtg	atcctgtggc	ttcagttgag	ctggggtttgg	60
	agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggacccctca	gtgttccaga	gggagccatt	120
	gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	gtttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
	tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatggtga	caaagaagat	240
	ggaaggttta	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
	tcccagccca	gtgattcagc	cacctacctc	tgtgccgcaa	ataatgcagg	caacatgctc	360
	acctttggag	ggggaacaag	gttaatggct	aaacct			396
	<210> 108						

<211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> dominio constante de cadena (P1, P18)alfa - modificación con Cys

<400> 108

```

gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag      60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct      120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac      180
agtgtgtgtg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc      240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc      300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc      360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtcc      420
10  agc                                     423

```

<210> 109
 <211> 423
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio constante de cadena (P15, P20)alfa - modificación con Cys

20 <400> 109

```

aatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag      60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct      120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac      180
agtgtgtgtg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc      240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc      300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc      360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtcc      420
20  agc                                     423

```

<210> 110
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio constante de cadena P22alfa - modificación con Cys

<400> 110

```

catatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag      60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct      120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac      180
agtgtgtgtg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc      240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc      300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc      360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtcc      420
35  agc                                     423

```

<210> 111
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> dominio variable de cadena P1beta

<400> 111

	atgggctgca	ggctgctctg	ctgtgcggtt	ctctgtctcc	tgggagcggg	cccatggaa	60
	acgggagtta	cgcagacacc	aagacacctg	gtcatgggaa	tgacaaataa	gaagtctttg	120
	aaatgtgaac	aacatctggg	gcataacgct	atgtattggg	acaagcaaag	tgctaagaag	180
	ccactggagc	tcatgtttgt	ctacaacttt	aaagaacaga	ctgaaaacaa	cagtgtgcca	240
	agtcgcttct	cacctgaatg	ccccaacagc	tctcacttat	tccttcacct	acacaccctg	300
	cagccagaag	actcggccct	gtatctctgt	gccagcagcc	aagatgaaca	gttcctctac	360
5	aatgagcagt	tcttcggggc	agggacacgg	ctcaccgtgc	ta		402

<210> 112

<211> 399

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena P15beta

15 <400> 112

	atgggacacca	gcctcctctg	ctggatggcc	ctgtgtctcc	tgggggcaga	tcacgcagat	60
	actggagtct	cccaggaccc	cagacacaag	atcacaaaga	ggggacagaa	tgtaactttc	120
	aggtgtgatc	caatttctga	acacaaccgc	ctttattggg	accgacagac	cctggggcag	180
	ggcccagagt	ttctgactta	cttccagaat	gaagctcaac	tagaaaaatc	aaggctgctc	240
	agtgatcggg	tctctgcaga	gaggcctaag	ggatctttct	ccaccttgga	gatccagcgc	300
	acagagcagg	gggactcggc	catgtatctc	tgtgccagca	gcttagctta	cgggaaagat	360
	acgcagtatt	ttggcccagc	caccggcgtg	acagtgtctc			399

<210> 113

20 <211> 393

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> dominio variable de cadena P18beta

<400> 113

	atgggctcct	ggaccctctg	ctgtgtgtcc	ctttgcatcc	tggtagcaaa	gcacacagat	60
	gctggagtta	tccagtcacc	ccggcacgag	gtgacagaga	tgggacaaga	agtgactctg	120
	agatgtaaac	caatttcagg	acatgactac	cttttctggg	acagacagac	catgatgcgg	180
	ggactggagt	tgctcattta	ctttaacaac	aacgttccga	tagatgattc	agggatgccc	240
	gaggatcgat	tctcagctaa	gatgcctaag	gcatcattct	ccactctgaa	gatccagccc	300
	tcagaaccca	gggactcagc	tgtgtacttc	tgtgccagca	gtgtctcggg	ttcggaagct	360
30	ttctttggac	aaggcaccag	actcacagtt	gta			393

<210> 114

<211> 384

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena P20beta

<400> 114

40

	atgggaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat	60
	gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg	120
	gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttcttgt atcgacaaga cccaggtctg	180
	gggctacggc tgatctattt ctcatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct	240
	gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgttct ccctgattct ggagtccgcc	300
	agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccaccagtc atcagcccca gcatttttgt	360
	gatgggactc gactctccat ccta	384
	<210> 115	
	<211> 387	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> dominio variable de cadena P22beta	
	<400> 115	
	atgggaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat	60
	gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg	120
	gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttcttgt atcgacaaga cccaggtctg	180
	gggctacggc tgatctattt ctcatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct	240
	gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgttct ccctgattct ggagtccgcc	300
	agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccagcagtt ctataaatga gcagttcttc	360
	gggccaggga cacggctcac cgtgcta	387
15	<210> 116	
	<211> 534	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> dominio constante de cadena (P18, P20)beta - modificación con Cys	
	<400> 116	
	gaggacctga acaaggtgtt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag	60
	atctcccaca cccaaaaggc cacactgggtg tgcctggcca caggcttctt ccccgaccac	120
	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtctg cacggacctg	180
	cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgctg	240
	agggctctcg ccaccttctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc	300
	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggatagg ccaaaccgt caccagatc	360
	gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttta cctcgggtgtc ctaccagcaa	420
	ggggctcctgt ctgccaccat cctctatgag atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct	480
25	gtgctgggtca gcgcccttgt gttgatggcc atggtcaaga gaaaggattt ctga	534
	<210> 117	
	<211> 1842	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> constructo P1alfa-P2A-P1beta - modificación con Cys	
35	<400> 117	

```

atgctgactg ccagcctgtt gagggcagtc atagcctcca tctgtgttgt atccagcatg      60
gctcagaagg taactcaagc gcagactgaa atttctgtgg tggagaagga ggatgtgacc      120
ttggactgtg tgtatgaaac ccgtgatact acttattact tattctggta caagcaacca      180
ccaagtggag aattggtttt ccttattcgt cggaactctt ttgatgagca aaatgaaata      240
agtggtcggt attccttgga cttccagaaa tccaccagtt ccttcaactt caccatcaca      300
gcctcacaag tcgtggactc agcagtatac ttctgtgtctc tgagtgaggc gcatagggat      360
agcaactatc agttaatctg gggcgctggg accaagctaa ttataaagcc agatatccag      420
aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc      480
ctattcaccg attttgattc tcaaacaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat      540
atcacagaca aatgtgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtgtg      600
gcctggagca acaaactctga ctttgcatgt gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca      660
gaagacacct tcttccccag cccagaaaagt tcctgtgatg tcaagctggg cgagaaaagc      720
tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc      780
ctcctgaaag tggccgggtt taatctgtctc atgacgtctgc ggctgtgggtc cagcgggtcc      840
ggagccacga acttctctct gttaaagcaa gcaggagacg tggagaaaaa ccccggtccc      900
atgggctgca ggctgtctct ctgtgcgggt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa      960
acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg     1020
aaatgtgaac aacatctggg gcataacgct atgtattggg acaagcaaag tgctaagaag     1080
ccactggagc tcatgtttgt ctacaacttt aaagaacaga ctgaaaacaa cagtgtgccca     1140
agtcgcttct cactgaatg cccaacagc tctcacttat tccttcacct acacaccctg     1200
cagccagaag actcggccct gtatctctgt gccagcagcc aagatgaaca gttcctctac     1260
aatgagcagt tcttcgggcc agggacacgg ctcaccgtgc tagaggacct gaaaaacgtg     1320
ttcccacccg aggtcgtgtg gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccaaaag     1380
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctgggtg     1440
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag     1500
cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc     1560
tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat     1620
gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg     1680
ggtagagcag actgtggctt cacctccgag tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc     1740
atcctctatg agatcttgct agggaaggcc accttgtatg ccgtgctggg cagtgccttc     1800
gtgctgatgg ccatggtcaa gagaaaggat tccagaggct ag                                1842

```

<210> 118

5 <211> 1842

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> constructo P1alfa-P2A-P1beta - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 118

atgctgacag	cctctctgct	gagagccgtg	atcgccagca	tctgctggt	gtccagcatg	60
gcccagaaaag	tgaccagggc	ccagaccgag	atcagcgtgg	tggaaaaaga	agatgtgacc	120
ctggactgcg	tgtacgagac	acgggacacc	acctactacc	tgttctggta	caagcagccc	180
cccagcggcg	agctggtgtt	cctgatccgg	cggaacagct	tcgacgagca	gaacgagatc	240
tccggccggt	acagctggaa	cttccagaag	tccaccagca	gcttcaactt	caccatcacc	300
gccagccagg	tgggtggacag	cgccgtgtac	ttctgcgccc	tgagcgaggc	ccaccgggac	360
agcaactacc	agctgatctg	gggagccggc	accaagctga	tcatcaagcc	cgacatccag	420
aacccccgacc	ccgccgtgta	ccagctgaga	gacagcaaga	gcagcgacaa	gagcgtgtgc	480
ctgttcaccg	acttcgacag	ccagaccaac	gtgtcccaga	gcaaggactc	cgacgtgtac	540
atcacccgata	agtgcgtgct	ggacatgcgg	agcatggact	tcaagagcaa	ctccgccgtg	600
gcctgggtcca	acaagagcga	cttcgcctgc	gccaacgcct	tcaacaacag	cattatcccc	660
gagggacacat	tcttcccaag	ccccgagagc	agctgcgacg	tgaagctggt	ggaaaagagc	720
ttcgagacag	acaccaacct	gaatttccag	aacctgagcg	tgatcggctt	ccggatcctg	780
ctgctgaagg	tggccggctt	caacctgctg	atgacctgct	ggctgtggtc	ctcaggttcc	840
ggagccacga	acttctctct	gttaaagcaa	gcaggagacg	tggaagaaaa	ccccggtccc	900
atgggctgcc	ggctgctgtg	ttgcgccgtg	ctgtgtctgc	tgggcgccgt	gcctatggaa	960
accggcgtga	cccagacccc	cagacacctg	gtcatgggca	tgaccaacaa	gaaaagcctg	1020
aagtgcgagc	agcacctggg	ccacaacgcc	atgtactggg	ataagcagag	cgccaagaaa	1080
cccctggaac	tgatgttcgt	gtacaacttc	aaagagcaga	ccgagaacaa	cagcgtgccc	1140
agccgggttca	gccccgagt	ccccaatagc	agccacctgt	ttctgcatct	gcacaccctg	1200
cagcccagag	actccgccct	gtacctgtgt	gccagcagcc	aggacgagca	gttcctgtac	1260
aatgagcagt	tcttcggccc	tggcaccgca	ctgacctgct	tggaagatct	gaagaacgtg	1320
ttccccccag	agggtggccgt	gttcgagcct	agcgaggccg	agatctccca	caccagaaa	1380
gccaccctcg	tgtgcctggc	caccggcttc	taccccgacc	acgtggaact	gtcttggtgg	1440
gtcaacggca	aagaggtgca	cagcggcgct	tgcaccgacc	cccagcccct	gaaagagcag	1500
cccgccctga	acgacagccg	gtactgcctg	agcagccgac	tcagagtgtc	cgccaccttc	1560
tggcagaacc	cccggaaacca	cttcagatgc	cagggtgcagt	tctacggcct	gagcgagaac	1620
gacgagtgga	cccaggaccg	ggccaagcct	gtgaccgaga	tcgtgtcagc	cgaggcctgg	1680
ggcagagccg	attgcggctt	caccagcgag	agctaccagc	agggcgtgct	gagcgccacc	1740
atcctgtacg	agatcctgct	gggcaaggcc	accctgtacg	ctgtgctggt	gtccgcctcg	1800
gtgctgatgg	ccatggtcaa	gcggaaggac	agccggggct	ga		1842

<210> 119

<211> 1854

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo P15alfa-P2A-P15beta - modificación con Cys

10

<400> 119

atggacaaga	tcttaggagc	atcattttta	gttctgtggc	ttcaactatg	ctgggtgagt	60
ggccaacaga	aggagaaaag	tgaccagcag	cagggtgaaac	aaagtcctca	atctttgata	120
gtccagaaaag	gagggatttc	aattataaac	tgtgcttatg	agaacactgc	gtttgactac	180

```

tttccatggt accaacaatt ccctgggaaa ggccctgcat tattgatagc catacgtcca 240
gatgtgagtg aaaagaaaga aggaagattc acaatctcct tcaataaaaag tgccaagcag 300
ttctcattgc atatcatgga ttcccagcct ggagactcag ccacctactt ctgtgcagca 360
agcccccagg gggctgggag ttaccaactc actttcggga aggggaccaa actctcggtc 420
ataccaaata tccagaaccc tgacctgtcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt 480
gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag 540
gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag 600
agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac 660
aacagcatta ttccagaaga cactttcttc cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag 720
ctggtcgaga aaagctttga aacagatacg aacctaaact ttcaaaacct gtcagtgatt 780
gggttccgaa tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaact tgctcatgac gctgcggctg 840
tggtccagcg gttccggagc cacgaacttc tctctgttaa agcaagcagg agcgtggaa 900
gaaaaccccc gtcccatggg caccagcctc ctctgtgga tggccctgtg tctcctggg 960
gcagatcacg cagatactgg agtctcccag gaccccagac acaagatcac aaagagggga 1020
cagaatgtaa ctttcaggtg tgatccaatt tctgaacaca accgccttta ttggtaccga 1080
cagaccctgg ggcaggggccc agagtctctg acttacttcc agaataagc tcaactagaa 1140
aatcaaggc tgctcagtga tcggttctct gcagagaggc ctaagggatc tttctccacc 1200
ttggagatcc agcgcacaga gcagggggac tcggccatgt atctctgtgc cagcagctta 1260
gcttacggga aagatacgca gtattttggc ccaggcaccc ggctgacagt gctcgaggac 1320
ctgaaaaacg tgttcccacc cgaggtcgct gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc 1380
cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg gccacaggct tctaccccga ccacgtggag 1440
ctgagctggt gggatgaatg gaaggaggtg cacagtggg tctgcacaga cccgcagccc 1500
ctcaaggagc agcccgcct caatgactcc agatactgcc tgagcagccg cctgaggggtc 1560
tcggccacct tctggcagaa cccccgcaac cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg 1620
ctctcggaga atgacgagtg gaccaggat agggccaaac ctgtcaccca gatcgtcagc 1680
gccgaggcct ggggtagagc agactgtggc ttcacctccg agtcttacca gcaaggggtc 1740
ctgtctgcca ccatcctcta tgagatcttg ctagggaagg ccaccttgta tgccgtgctg 1800
gtcagtcccc tcgtgctgat ggccatggtc aagagaaagg attccagagg ctac 1854

```

<210> 120

<211> 1854

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo P15alfa-P2A-P15beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10

<400> 120

atggacaaga	tcctgggctg	cagcttcctg	gtgctgtggc	tgcagctgtg	ctgggtgtcc	60
ggccagcaga	aagagaagtc	cgaccagcag	cagggtcaa	agagccccc	gagcctgatc	120
gtgcagaagg	gcggcatcag	catcatcaac	tgcgcctacg	agaataccgc	cttcgactac	180
ttcccctggg	atcagcagtt	ccccggcaag	ggacctgccc	tgctgatcgc	catcagaccc	240
gacgtgtccg	agaagaaaga	gggcccgttc	accatcagct	tcaacaagag	cgccaagcag	300
ttcagcctgc	acatcatgga	cagccagccc	ggcgacagcg	ccacctactt	ttgtgccgcc	360
agccctcagg	gcgctggcag	ctaccacctg	accttcggca	agggcaccaa	gctgagcgtg	420
atcccccaaca	tccagaaccc	cgaccccgcc	gtgtaccagc	tgcgggacag	caagagcagc	480
gacaagagcg	tgtgcctggt	caccgacttc	gacagccaga	ccaacgtgtc	ccagagcaag	540
gacagcgacg	tgtacatcac	cgataagtgc	gtgctggaca	tgcggagcat	ggacttcaag	600
agcaacagcg	ccgtggcctg	gtccaacaag	tccgacttcg	cctgcgcaa	cgccttcaac	660
aacagcatca	tccccgagga	cacattcttc	ccaagccccg	agagcagctg	cgacgtgaag	720
ctggtggaaa	agagcttcga	gacagacacc	aacctgaact	tccagaacct	gtccgtgatc	780
ggcttccgga	tcctgctgct	gaaggtggcc	ggcttcaacc	tgctgatgac	cctgcggctg	840
tggtccagcg	gttccggagc	cacgaacttc	tctctgttaa	agcaagcagg	agacgtggaa	900
gaaaaccccc	gtcccatggg	caccagcctg	ctgtgctgga	tggccctgtg	cctgctgggc	960
gccgatcacg	ctgataccgg	cgtgtcccag	gacccccggc	acaagatcac	caagcggggc	1020
cagaacgtga	ccttcagatg	cgaccccatc	agcagcacca	accggctgta	ctggtacaga	1080
cagaccctcg	gccagggacc	cgagttcctg	acctacttcc	agaatgaggc	ccagctggaa	1140
aagtcccggc	tgctgagcga	ccggttcagc	gccgaacggc	ccaagggcag	cttcagcacc	1200
ctggaaatcc	agcggaccga	gcagggagac	tccgccatgt	acctgtgtgc	cagcagcctg	1260
gcctacggca	aggacacaca	gtacttcggc	cctggcaccc	ggctgaccgt	gctggaagat	1320
ctgaagaacg	tgttcccccc	agaggtggcc	gtgttcgagc	ccagcgaggc	cgagatctct	1380
cacaccaga	aagccaccct	ggtctgcctg	gccaccggct	tctaccccca	ccacgtggaa	1440
ctgtcttggg	gggtcaacgg	caaagaggtc	cacagcggcg	tctgcaccga	ccccagccc	1500
ctgaaagagc	agcccgcctt	gaacgactct	cggtaactgc	tgagcagccg	gctgagagtg	1560
tccgccacct	tctggcagaa	cccccggaac	cacttcagat	gccaggtgca	gttctacggc	1620
ctgagcgaga	acgacgagtg	gacccaggac	cgggccaagc	ccgtgaccca	gattgtgtct	1680
gccgaggcct	ggggcagagc	cgattgcggc	ttcaccagcg	agagctacca	gcagggcgtg	1740
ctgagcgcca	ccatcctgta	cgagatcctg	ctgggcaagg	ccaccctgta	cgcctgtctg	1800
gtgtccgctc	tggtgctgat	ggccatggtc	aaacggaagg	acagccgggg	ctga	1854

<210> 121

5 <211> 1824

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> constructo P18alfa-P2A-P18beta - modificación con Cys

<400> 121

atgtcacttt	ctagcctgct	gaaggtggtc	acagcttcac	tgtggctagg	acctggcatt	60
gcccagaaga	taactcaaac	ccaaccagga	atgttcgtgc	aggaaaagga	ggctgtgact	120
ctggactgca	catatgacac	cagtgatcaa	agttatggtc	tattctggta	caagcagccc	180
agcagtgggg	aaatgatttt	tcttatttat	caggggtctt	atgacgagca	aaatgcaaca	240
gaaggtcgct	actcattgaa	tttccagaag	gcaagaaaat	ccgccaacct	tgtcatctcc	300
gcttcacaac	tgggggactc	agcaatgtat	ttctgtgcaa	tcccgactct	catggatagc	360
aactatcagt	taatctgggg	cgctgggacc	aagctaatta	taaagccaga	tatccagaac	420
cctgaccctg	ccgtgtacca	gctgagagac	tctaaatcca	gtgacaagtc	tgtctgccta	480
ttcacccgatt	ttgattctca	aacaaatgtg	tcacaaagta	aggattctga	tgtgtatatc	540
acagacaaat	gtgtgctaga	catgaggtct	atggacttca	agagcaacag	tgtgtgggcc	600
tggagcaaca	aatctgactt	tgcatgtgca	aacgccttca	acaacagcat	tattccagaa	660
gacaccttct	tccccagccc	agaaaagttcc	tgtgatgtca	agctggtcga	gaaaagcttt	720
gaaacagata	cgaacctaaa	ctttcaaaac	ctgtcagtga	ttgggttccg	aatcctcctc	780
ctgaaagtgg	ccgggtttta	tctgctcatg	acgctgcggc	tgtggtccag	cggttccgga	840
gccacgaact	tctctctgtt	aaagcaagca	ggagacgtgg	aagaaaaccc	cggtcccatg	900
ggctcctgga	ccctctgctg	tgtgtccctt	tgcctcctgg	tagcaaagca	cacagatgct	960
ggagttatcc	agtcaccccg	gcacgaggtg	acagagatgg	gacaagaagt	gactctgaga	1020
tgtaaaccaa	tttcaggaca	tgactacctt	ttctgggtaca	gacagaccat	gatgcgggga	1080
ctggagttgc	tcatthtactt	taacaacaac	gttccgatag	atgattcagg	gatgcccgag	1140
gatcgattct	cagctaagat	gcctaagtca	tcattctcca	ctctgaagat	ccagccctca	1200
gaacccaggg	actcagctgt	gtacttctgt	gccagcagtg	tctcgggttc	ggaagctttc	1260
tttggaacaag	gcaccagact	cacagttgta	gaggacctga	acaaggtgtt	cccacccgag	1320
gtcgctgtgt	ttgagccatc	agaagcagag	atctcccaca	ccaaaaggc	cacactggtg	1380
tgccctggcca	caggcttctt	ccccgaccac	gtggagctga	gctgggtggg	gaatgggaag	1440
gaggtgcaca	gtggggtctg	cacggacccg	cagcccctca	aggagcagcc	cgccctcaat	1500
gactccagat	actgcctgag	cagccgcctg	agggtctcgg	ccaccttctg	gcagaacccc	1560
cgcaaccact	tccgctgtca	agtccagttc	tacgggctct	cggagaatga	cgagtggacc	1620
caggataggg	ccaaacccgt	caccagatc	gtcagcgccg	aggcctgggg	tagagcagac	1680
tgtggcttta	cctcggtgtc	ctaccagcaa	ggggtcctgt	ctgccaccat	cctctatgag	1740
atcctgctag	ggaaggccac	cctgtatgct	gtgctgggtca	gcgcccttgt	gttgatggcc	1800
atggtcaaga	gaaaggattt	ctga				1824

<210> 122

<211> 1824

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo P18alfa-P2A-P18beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10

<400> 122

atgagcctga	gcagcctgct	gaaggtgggtg	accgcctctc	tgtggctggg	ccctggcatt	60
gcccagaaga	tcacccagac	ccagcccgcc	atgttcgtgc	aggaaaaaga	agccgtcacc	120
ctggactgca	cctacgacac	cagcgatcag	agctacggcc	tgttctggta	caagcagccc	180
agcagcgggc	agatgatctt	cctgatctac	cagggcagct	acgacgagca	gaacgccacc	240

```

gaggggccggt acagcctgaa cttccagaag gcccgggaagt ccgccaatct ggtgatcagc 300
gccagccagc tgggcgacag cgccatgtac ttttgcgcca tccccaccct gatggacagc 360
aactaccagc tgatctgggg agccggcacc aagctgatca tcaagcccga catccagaac 420
cccgaccccg ccgtgtacca gctgagagac agcaagagca gcgacaagag cgtgtgcctg 480
ttcaccgact tcgacagcca gaccaacgtg tcccagagca aggactccga cgtgtacatc 540
accgataagt gcgtgctgga catgcggagc atggacttca agagcaactc cgccgtggcc 600
tgggtccaaca agagcgactt cgctgcgcc aacgccttca acaacagcat tatccccgag 660
gacacattct tcccaagccc cgagagcagc tgcgacgtga agctggtgga aaagagcttc 720
gagacagaca ccaacctgaa tttccagaac ctgagcgtga tcggcttccg gatcctgctg 780
ctgaaggtgg ccggcttcaa cctgctgatg accctgcggc tgttgtcctc tggttccgga 840
gccacgaact tctctctgtt aaagcaagca ggagacgtgg aagaaaaccc cggtcccatg 900
ggcagctgga ccctgtgctg cgtgagcctg tgcctcctgg tggccaagca caccgacgcc 960
ggcgtcatcc agagccccag gcacgaggtg accgagatgg gccaggaagt gaccctgcgc 1020
tgcaagccca tcagcggcca cgactacctg ttctggtaca ggcagaccat gatgcggggc 1080
ctggaactgc tgatctactt caacaacaac gtgcccacg acgacagcgg catgcccag 1140
gaccggttca gcgccaagat gcccacgcc agcttcagca ccctgaagat ccagcccagc 1200
gagccccggg actctgccgt gtatttctgt gcctcctccg tgtccggcag cgaggccttc 1260
tttgggcagg gcaccagact gacagtgggt gaggacctga acaaggtgtt ccccccgag 1320
gtggccgtgt ttgagcccag cgaggccgag atcagccaca cccagaaagc caccctggtg 1380
tgcctggcca ccggcttttt ccccgaccac gtggagctgt cttggtgggt gaacggcaaa 1440
gaggtgcaca gcggcgtctg caccgacccc cagcccctga aagagcagcc cgccctgaac 1500
gacagccggt actgcctgag cagcagactg cgggtgtccg ccaccttctg gcagaacccc 1560
cggaaccact tccggtgcca ggtgcagttc tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc 1620
caggatagag ccaagcctgt gaccagatc gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgac 1680
tgccgcttca ccagcgtgtc ctaccagcag ggggtgctgt ccgccacaat cctgtacgag 1740
atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc gtgctggtgt ccgctctggt gctgatggcc 1800
atggtgaagc ggaaggactt ctga 1824

```

<210> 123
 <211> 1800
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo P20alfa-P2A-P20beta - modificación con Cys

10
 <400> 123


```

atgatgaaat ccttgagagt tttactagt atcctgtggc ttcagttgag ctggggttgg 60
agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggacccctca gtgttccaga gggagccatt 120
gcctctctca actgcactta cagtgaccga ggttcccagt ctttcttctg gtacagacaa 180
tattctggga aaagccctga gttgataatg tccatatact ccaatggtga caaagaagat 240
ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac 300
tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtgt tagaaggcca gaagctgctc 360
tttgcaaggg ggaccatgtt aaaggtggat cttaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420
taccagctga gagactctaa atccagtgc aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaatgtgtg 540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 600
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattatcc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780
tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagcgggt ccggagccac gaacttctct 840
ctgttaaagc aagcaggaga cgtggaagaa aaccccggtc ccatgggaat caggctcctg 900
tgtcgtgtgg ccttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc 960
tcgagatatc tagtcaaaaag gacgggagag aaagttttcc tggaatgtgt ccaggatatg 1020
gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat 1080
ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatattc ctgaggggta cagtgtctct 1140
agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct 1200
atgtacctct gtgccaccag tcatcagccc cagcattttg gtgatgggac tcgactctcc 1260
atcctagagg acctgaacaa ggtgttccca cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa 1320
gcagagatct cccacaccca aaaggccaca ctggtgtgcc tggccacagg cttcttcccc 1380
gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcacg 1440
gacccgcagc cctcaagga gcagcccgcc ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc 1500
cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc 1560
cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag tggaccagg atagggccaa acccgtcacc 1620
cagatcgtca gcgccgagc ctggggtaga gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac 1680
cagcaagggg tcctgtctgc caccatcctc tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg 1740
tatgctgtgc tggtcagcgc cttgtgttg atggccatgg tcaagagaaa ggatttctga 1800

```

<210> 124

5 <211> 1800

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> constructo P20alfa-P2A-P20beta - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 124

atgatgaagt	ccctgcgggt	gctgctggtc	atcctgtggc	tgcagctgag	ctgggtctgg	60
tcccagcaga	aagaggtgga	acagaacagc	ggccctctga	gcgtgccga	aggcgctatc	120
gccagcctga	actgcaccta	cagcgaccgg	ggcagccaga	gcttcttctg	gtacagacag	180
tacagcggca	agagccccga	gctgatcatg	agcatctaca	gcaacggcga	caaagaggac	240
ggccgggttca	ccgcccagct	gaacaaggcc	agccagtagc	tgtccctgct	gatccgggac	300
agccagccca	gcgacagcgc	cacatacctg	tgcgccgtgc	tggaaggcca	gaagctgctg	360
ttcgccagag	gcaccatgct	gaaggtggac	ctgaacatcc	agaaccccga	ccccgccgtg	420
taccagctgc	gggatagcaa	gagcagcgac	aagagcgtgt	gcctgttcac	cgacttcgac	480
agccagacca	acgtgtccca	gagcaaggac	agcgacgtgt	acatcaccga	taagtgcgtg	540
ctggacatgc	ggagcatgga	cttcaagagc	aacagcgccg	tggcctggtc	caacaagagc	600
gacttcgcct	gcgccaacgc	cttcaacaac	agcattatcc	ccgaggacac	attcttccca	660
agccccgaga	gcagctgcga	cgtgaagctg	gtggaaaaga	gcttcgagac	agacaccaac	720
ctcaacttcc	agaacctgag	cgtgatcggc	ttccggatcc	tgctgctgaa	agtggccggc	780
ttcaacctgc	tgatgaccct	gcggctgtgg	tccagcgggt	ccggagccac	gaacttctct	840
ctgttaaagc	aagcaggaga	cgtggaagaa	aaccccggtc	ccatgggcat	ccggctgctg	900
tgcagagtgg	ccttctgctt	cctggccgtg	ggcctgggtg	acgtgaaagt	gaccagagc	960
agcagatacc	tgggtcaagcg	gaccggcgag	aagggtgttc	tggaatgcgt	gcaggatatg	1020
gaccacgaga	acatgttttg	gtacaggcag	gaccctggac	tgggcctgcg	gctgatctac	1080
ttctcctacg	acgtgaagat	gaaggaaaag	ggcgacatcc	ccgagggcta	cagcgtgtcc	1140
agagagaaga	aagagcgggt	cagcctgatc	ctggaaagcg	ccagcaccaa	ccagaccagc	1200
atgtacctgt	gtgccacctc	ccaccagccc	cagcactttg	gcgacggcac	ccggctgagc	1260
atcctggaag	atctgaacaa	ggtgttcccc	ccagaggtgg	ccgtgttcga	gcctagcgag	1320
gccgagatca	gccacaccca	gaaagccacc	ctcgtgtgcc	tggccaccgg	ctttttcccc	1380
gaccacgtgg	aactgtcttg	gtgggtcaac	ggcaaagagg	tgcacagcgg	cgtctgcacc	1440
gacccccagc	ccctgaaaga	gcagcccgc	ctgaacgaca	gccggtactg	cctgagcagc	1500
cgactgagag	tgtccgccac	cttctggcag	aacccccgga	accacttcag	atgccaggtg	1560
cagttctacg	gcctgagcga	gaacgacgag	tggacacagg	accggggcaa	gcccgtgacc	1620
cagatcgtgt	cagccgaggg	ctggggcaga	gccgattgcg	gcttcaccag	cgtgtcctat	1680
cagcagggcg	tgctgagcgc	caccatcctg	tacgagatcc	tgctgggcaa	ggccaccctg	1740
tatgccgtgc	tgggtgtccgc	cctggtgctg	atggccatgg	tcaagagaaa	ggacttctga	1800

<210> 125

<211> 1812

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo P22alfa-P2A-P22beta - modificación con Cys

10

<400> 125

atgatgaaat	ccttgagagt	tttactagt	atcctgtggc	ttcagttgag	ctgggtttgg	60
agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggacccctca	gtgttccaga	gggagccatt	120
gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	gtttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatggtga	caaagaagat	240
ggaaggttta	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
tcccagccca	gtgattcagc	cacctacctc	tgtgccgcaa	ataatgcagg	caacatgctc	360
acctttggag	ggggaacaag	gttaatggtc	aaaccccata	tccagaaccc	tgaccctgcc	420
gtgtaccagc	tgagagactc	taaatccagt	gacaagtctg	tctgcctatt	caccgatttt	480

```

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt 540
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 600
tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 660
cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag ctggtcgaga aaagctttga aacagatacg 720
aacctaaact ttcaaaacct gtcagtgtatt gggttccgaa tcctcctcct gaaagtggcc 780
gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg tgggtccagcg gttccggagc cacgaacttc 840
tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa gaaaaccccg gtcccatggg aatcaggctc 900
ctgtgtcgtg tggccttttg tttcctggct gtaggcctcg tagatgtgaa agtaaccag 960
agctcgagat atctagtcaa aaggacggga gagaaagttt ttctggaatg tgtccaggat 1020
atggaccatg aaaatatgtt ctggtatcga caagaccag gtctggggct acggctgac 1080
tatttctcat atgatgttaa aatgaaagaa aaaggagata ttctgaggg gtacagtgtc 1140
tctagagaga agaaggagcg cttctccctg attctggagt ccgccagcac caaccagaca 1200
tctatgtacc tctgtgccag cagttctata aatgagcagt tcttcggggc agggacacgg 1260
ctcaccgtgc tagaggacct gaaaaacgtg ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca 1320
tcagaagcag agatctccca caccctaaaag gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc 1380
taccctgacc acgtggagct gagctggtgg gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc 1440
tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag cccgccctca atgactccag atactgcctg 1500
agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt 1560
caagtccagt tctacgggct ctcgagagaat gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct 1620
gtcaccacaga tcgtcagcgc cgaggcctgg ggtagagcag actgtggctt cacctccgag 1680
tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc atcctctatg agatcttgct agggaaggcc 1740
accttgatg ccgtgctggt cagtgccctc gtgctgatgg ccatgggtcaa gagaaaggat 1800
tccagaggct ag 1812

```

<210> 126

<211> 1812

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo P22alfa-P2A-P22beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10

<400> 126

```

atgatgaagt ccctgcgggt gctgctggtc atcctgtggc tgcagctgag ctgggtctgg      60
tcccagcaga aagaggtgga acagaacagc ggccctctga gcgtgccga aggcgctatc      120
gccagcctga actgcaccta cagcgaccgg gtgtcccaga gcttcttctg gtacagacag      180
tacagcggca agagccccga gctgatcatg agcatctaca gcaacggcga caaagaggac      240
ggccggttca ccgcccagct gaacaaggcc agccagtacg tgtccctgct gatccgggac      300
agccagccca gcgacagcgc cacatacctg tgcgccgcca acaacgccgg caacatgctg      360
accttcggcg gaggcacccg gctgatggtc aagccccaca tccagaacct cgaccccgcc      420
gtgtaccagc tgcgggatat caagagcagc gacaagagcg tgtgcctgtt caccgacttc      480
gacagccaga ccaacgtgtc ccagtccaag gacagcgacg tgtacatcac cgataagtgc      540
gtgctggaca tgcggagcat ggacttcaag agcaacagcg ccgtggcctg gtccaacaag      600
agcgacttcg cctgcgccaa cgccttcaac aacagcatta tccccgagga cacattcttc      660
ccaagccccg agagcagctg cgacgtgaag ctgggtgaaa agagcttcga gacagacc      720
aacctgaact tccagaacct gagcgtgatc ggcttcggga tcctgctgct gaaggtggcc      780
ggcttcaacc tgctgatgac cctgcggctg tgggtccagcg gttccggagc cacgaacttc      840
tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa gaaaaccccg gtcccatggg catccggctg      900
ctgtgcagag tggccttctg cttcctggcc gtgggcctgg tggacgtgaa agtgaccag      960
agcagcagat acctgggtcaa gcggaccggc gagaaggtgt tcctggaatg cgtgcaggat     1020
atggaccacg agaacatgtt ttggtacagg caggatcctg gactgggact gcggctgatc     1080
tacttctcct acgacgtgaa gatgaaggaa aagggcgaca tccccgaggg ctacagcgtg     1140
tccagagaga agaaagagcg gttcagcctg atcctggaaa gcgccagcac caaccagacc     1200
agcatgtacc tgtgtgccag cagcagcatc aacgagcagt tcttcggccc tggcaccaga     1260
ctgaccgtgc tggaagatct gaagaacgtg ttccccccag aggtggccgt gttcgagcct     1320
agcgaggccg agatcagcca caccagaaa gccaccctcg tgtgcctggc caccggcttc     1380
taccocgacc acgtggaact gtcttgggtg gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgctc     1440
tgcaccgacc cccagcccct gaaagagcag cccgccctga acgacagccg gtactgcctg     1500
agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc tggcagaacc cccggaacca cttcagatgc     1560
caggtgcagt tttacggcct gagcgagaac gacgagtgga cccaggaccg ggccaagccc     1620
gtgaccaga tcgtgtcagc cgaggcctgg ggcagagccg attgcggctt caccagcgag     1680
agctaccagc agggcgtgct gagcgccacc atcctgtacg agatcctgct gggcaaggcc     1740
accctgtacg ccgtgctggt gtccgccctg gtgctgatgg ccatgggtcaa gagaaaggac     1800
agccggggct ga                                             1812

```

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de VEB

<400> 127

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado, estando el polinucleótido con codones optimizados, que codifica para una proteína de unión que comprende:
 - (a) un dominio variable de cadena α (V_α) de receptor de células T (TCR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR1) de SEQ ID NO.:23, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de SEQ ID NO.:24 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de una cualquiera de las SEQ ID NO.:25 y 26; y
 - (b) un dominio variable de cadena β (V_β) de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de CDR1 de SEQ ID NO.:27, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de SEQ ID NO.:28 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de SEQ ID NO.:29,
 en el que la proteína de unión codificada es capaz de:
 - (i) unirse específicamente a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):antígeno leucocitario humano (HLA) en una superficie celular independientemente o en ausencia de CD8; y/o
 - (ii) unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 con una K_d menor de o igual a aproximadamente 8 nM.
2. Polinucleótido aislado según la reivindicación 1, en el que
 - (a) la proteína de unión codificada comprende un dominio V_α que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 ó 2 y comprende un dominio V_β que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:9, siempre que la proteína de unión sea capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM; o
 - (b) la proteína de unión codificada comprende un dominio V_α que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 ó 2 y el dominio V_β codificado que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:9, siempre que la proteína de unión sea capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM; o
 - (c) el dominio V_α codificado tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 ó 2, siempre que la proteína de unión sea capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM; y/o
 - (d) el dominio V_α codificado comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 ó 2; y/o
 - (e) el dominio V_β codificado tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:9, siempre que la proteína de unión sea capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM; y/o
 - (f) el dominio V_β codificado comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9; y/o
 - (g) la proteína de unión codificada comprende el dominio V_α codificado de (c) o (d) en combinación con el dominio V_β codificado de (e) o (f).
3. Polinucleótido aislado según la reivindicación 1 ó 2, en el que
 - (a) el dominio V_α codificado comprende un dominio constante de cadena α que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3 ó 4; y/o
 - (b) el dominio V_β codificado comprende un dominio constante de cadena β que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:10 u 11; y/o
 - (c) la proteína de unión codificada comprende una cadena α de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO.:5-8 y una cadena β de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:12 ó 13, en la que preferiblemente
 - (c1) la proteína de unión codificada comprende una cadena α de TCR que comprende o consiste en la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una cadena β de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:12;

(c2) la proteína de unión codificada comprende una cadena α de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:7 y una cadena β de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:12;

(c3) la proteína de unión codificada comprende una cadena α de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6 y una cadena β de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:13;

o

(c4) la proteína de unión codificada comprende una cadena α de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:8 y una cadena β de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:13.

4. Polinucleótido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína de unión codificada es capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201 con una K_d menor de o igual a aproximadamente 5 nM, preferiblemente menor de o igual a aproximadamente 3 nM.

5. Vector de expresión, que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, unido operativamente a una secuencia de control de la expresión, en el que el vector es un vector viral opcionalmente seleccionado de un vector lentiviral o un vector γ -retroviral.

6. Vector de expresión según la reivindicación 5, en el que el vector es capaz de administrar el polinucleótido a una célula huésped, en el que la célula huésped es una célula progenitora hematopoyética o una célula del sistema inmunitario humana, en el que la célula del sistema inmunitario humana es una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T doble negativa CD4⁻ CD8⁻, una célula T $\gamma\delta$, un linfocito citolítico natural, una célula dendrítica o cualquier combinación de los mismos.

7. Vector de expresión según la reivindicación 6, en el que la célula T es una célula T indiferenciada, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o cualquier combinación de las mismas.

8. Célula huésped recombinante, que comprende un polinucleótido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que la célula huésped expresa en su superficie celular la proteína de unión codificada por el polinucleótido.

9. Célula huésped recombinante según la reivindicación 8, en la que el polinucleótido

(a) codifica para el dominio V_α y tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:78 u 80 y codifica para el dominio V_β y tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:89; y/o

(b) codifica para el dominio V_α y comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:78 u 80; y/o

(c) codifica para el dominio V_β y comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:89.

10. Célula huésped recombinante según las reivindicaciones 8 ó 9, en la que:

(a) el dominio V_α que codifica para el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio constante de cadena α que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:82 u 84; y/o

(b) el dominio V_β que codifica para el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio constante de cadena β que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:92 ó 93.

11. Célula huésped recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el polinucleótido comprende:

(a) una cadena α de TCR que codifica para el polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:86 y una cadena β de TCR que codifica para el polinucleótido que comprende

o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:95; o

(b) una cadena α de TCR que codifica para el polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:87 y una cadena β de TCR que codifica para el polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:95.

12. Célula huésped recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en la que el polinucleótido codifica para un péptido autoescindible dispuesto entre una cadena α de TCR que codifica para el polinucleótido y una cadena β de TCR que codifica para el polinucleótido, opcionalmente en la que el polinucleótido que codifica para la cadena α de TCR, el péptido autoescindible y la cadena β de TCR comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:96 ó 97.

13. Célula huésped recombinante según la reivindicación 12, en la que

(a) el polinucleótido que codifica para el péptido autoescindible comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO.:98-101, o

(b) el polinucleótido codifica para un péptido autoescindible que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO.:17-20.

14. Célula huésped recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.

15. Célula huésped recombinante para su uso según la reivindicación 14, en la que la célula huésped es una célula progenitora hematopoyética o una célula del sistema inmunitario humana, en la que la célula del sistema inmunitario es una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T doble negativa CD4⁻ CD8⁻, una célula T $\gamma\delta$, un linfocito citolítico natural, una célula dendrítica o cualquier combinación de los mismos.

16. Célula huésped recombinante para su uso según la reivindicación 15, en la que la célula T es una célula T indiferenciada, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o cualquier combinación de las mismas.

17. Célula huésped recombinante para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en la que el trastorno hiperproliferativo es una neoplasia maligna hemática seleccionada de leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia eosinofílica crónica (LEC), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma no Hodgkin (LNH) o mieloma múltiple (MM); o un cáncer sólido seleccionado de cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, carcinoma de huesos y tejidos blandos, tumor de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, adenocarcinoma colorrectal, cáncer colorrectal, tumor desmoide, cáncer embrionario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multiforme, tumor ginecológico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal de páncreas, tumor astrocítico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rabdomiosarcoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinativas de testículo, cáncer urotelial, sarcoma uterino o cáncer de útero.

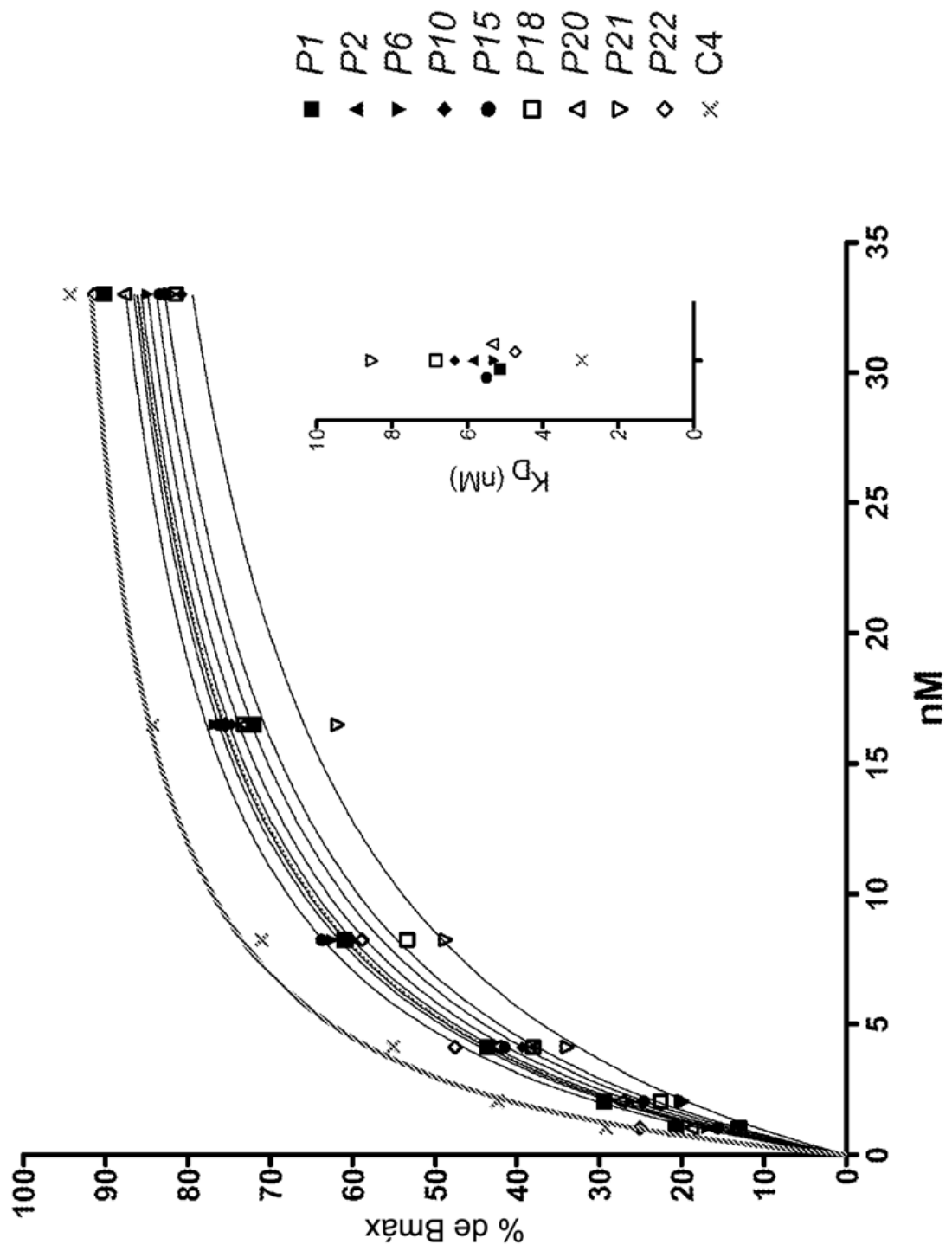


Fig. 1

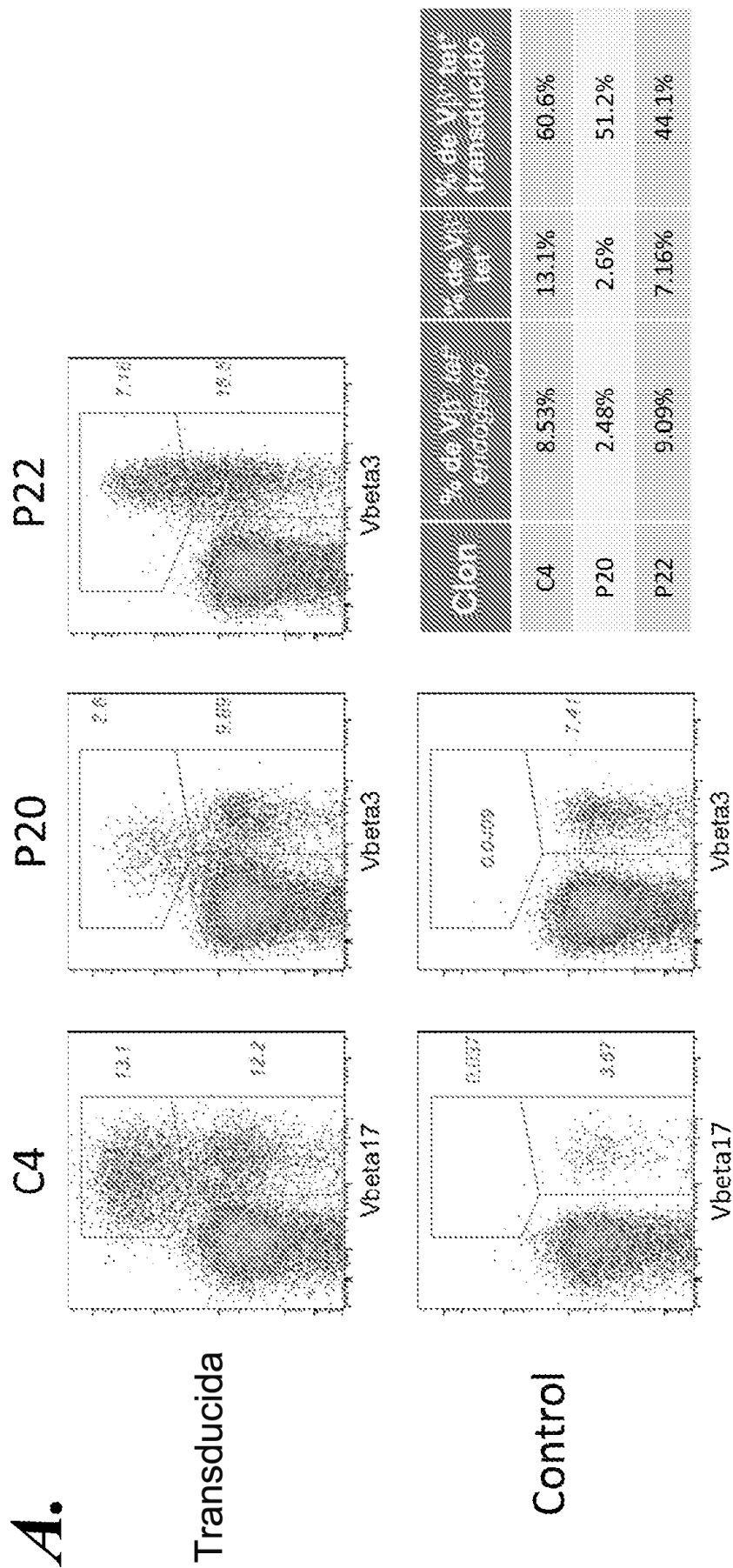


Fig. 2A

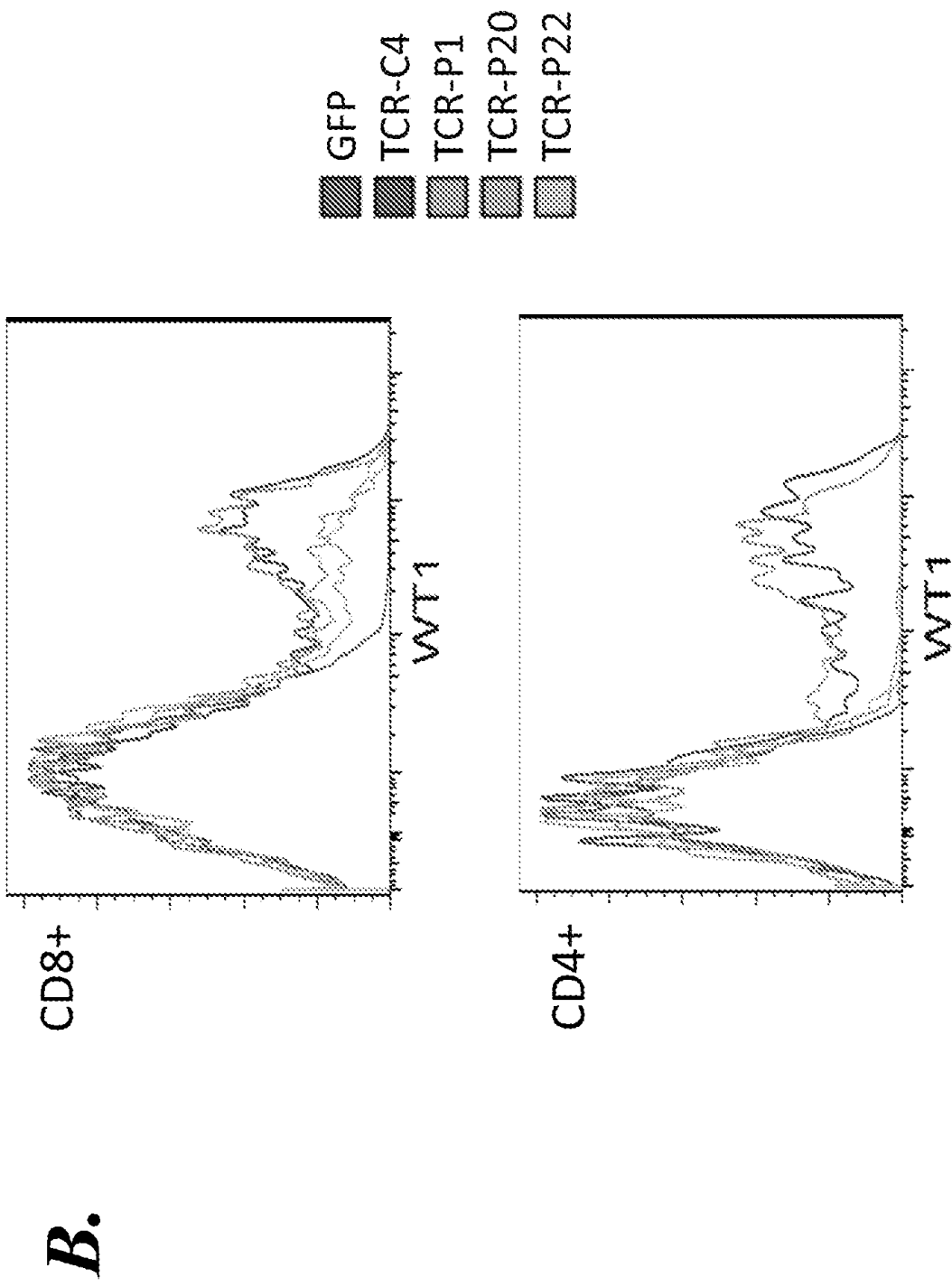


Fig. 2B

A.

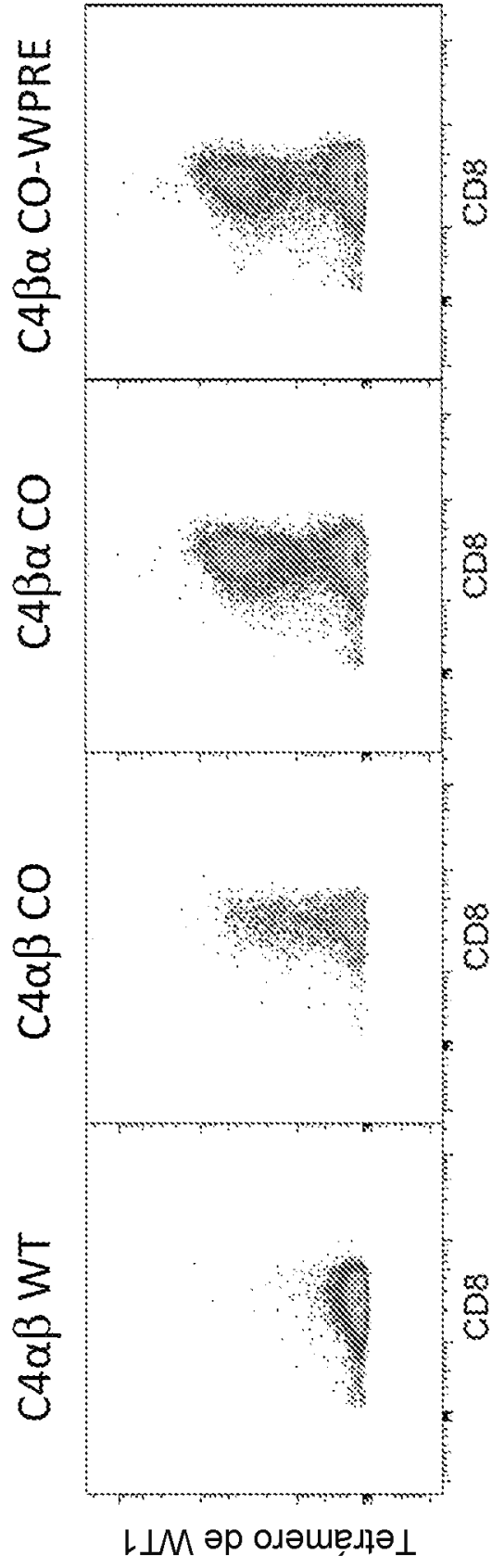


Fig. 3A

B.

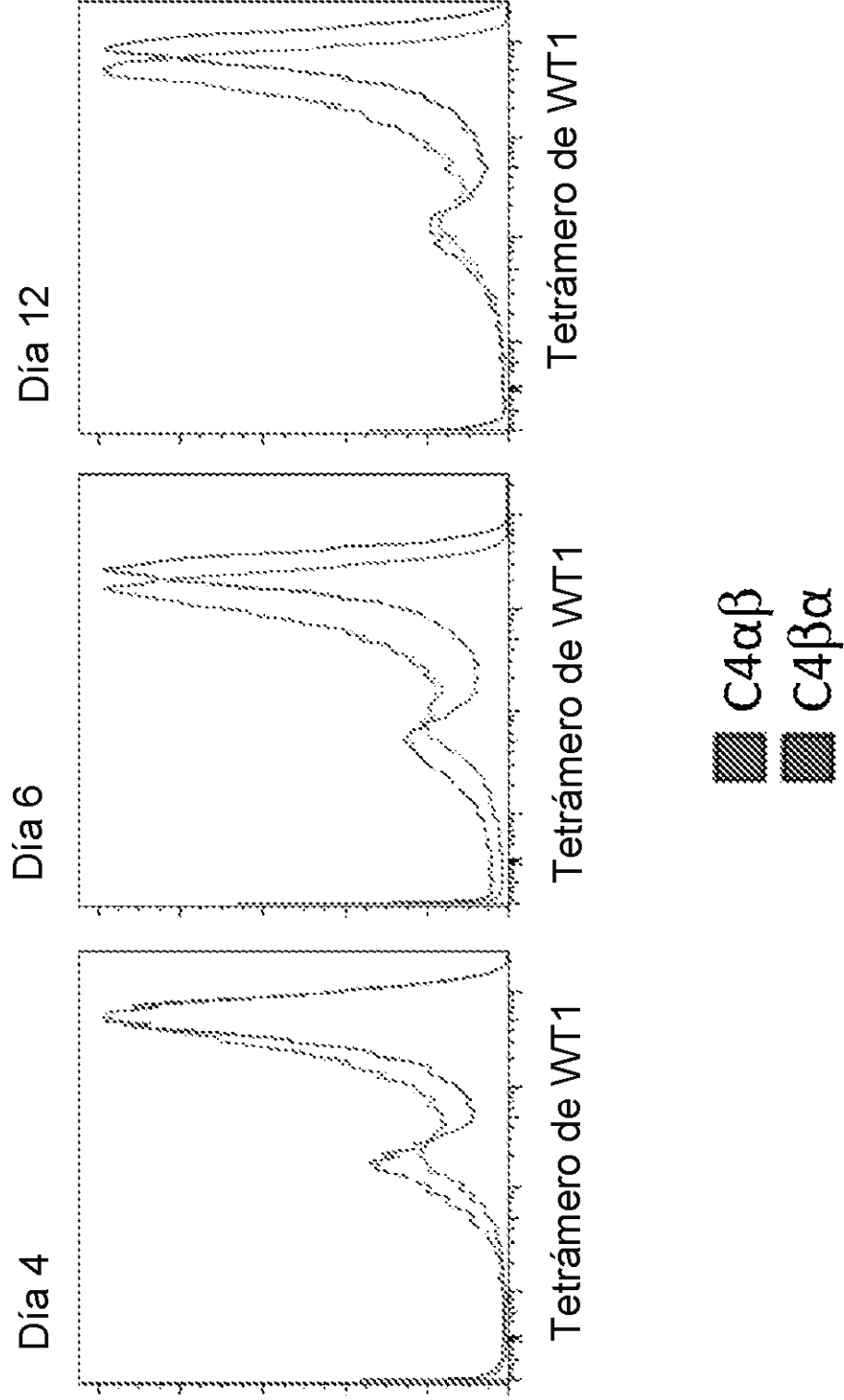


Fig. 3B

C.

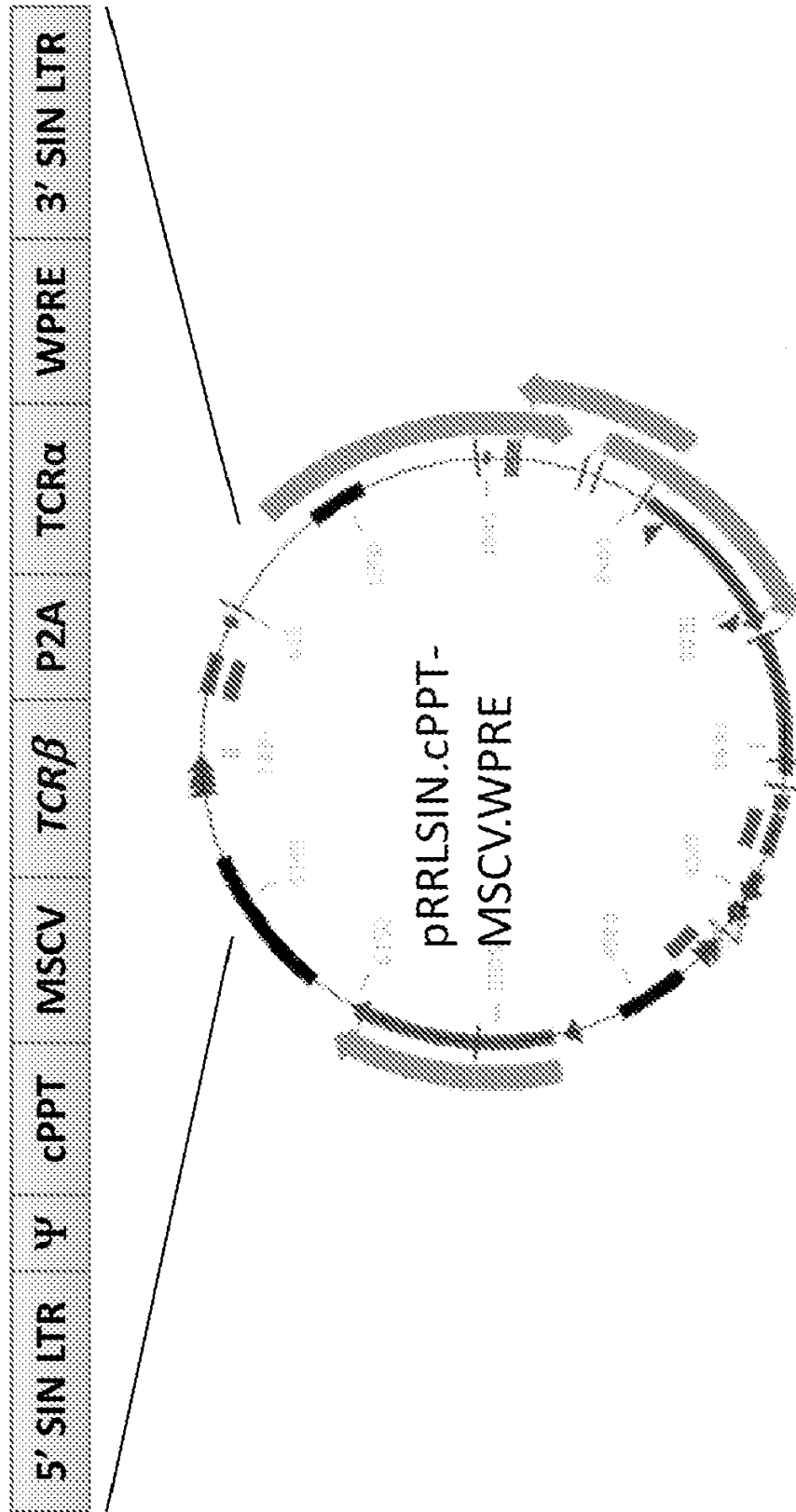


Fig. 3C

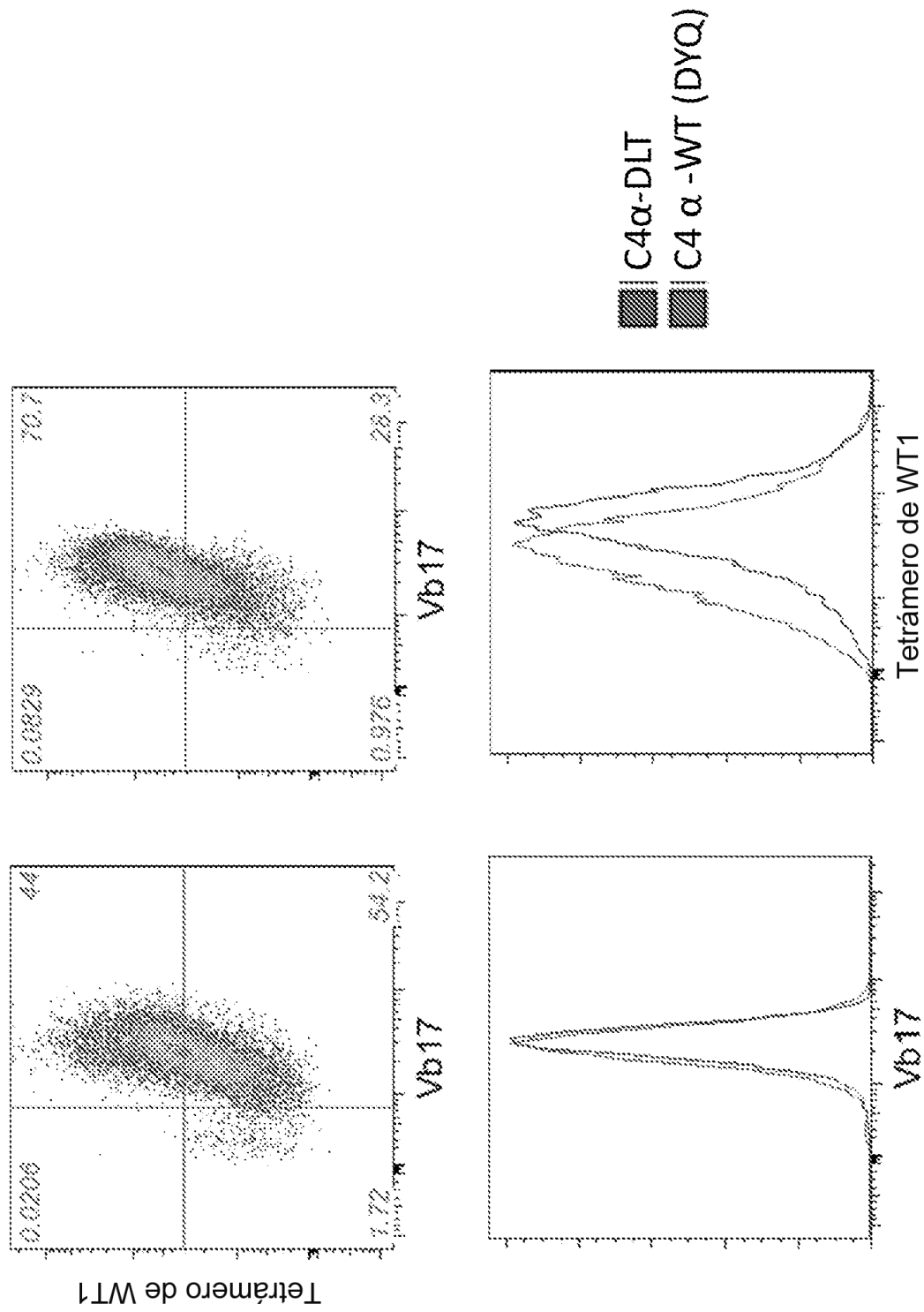


Fig. 4A

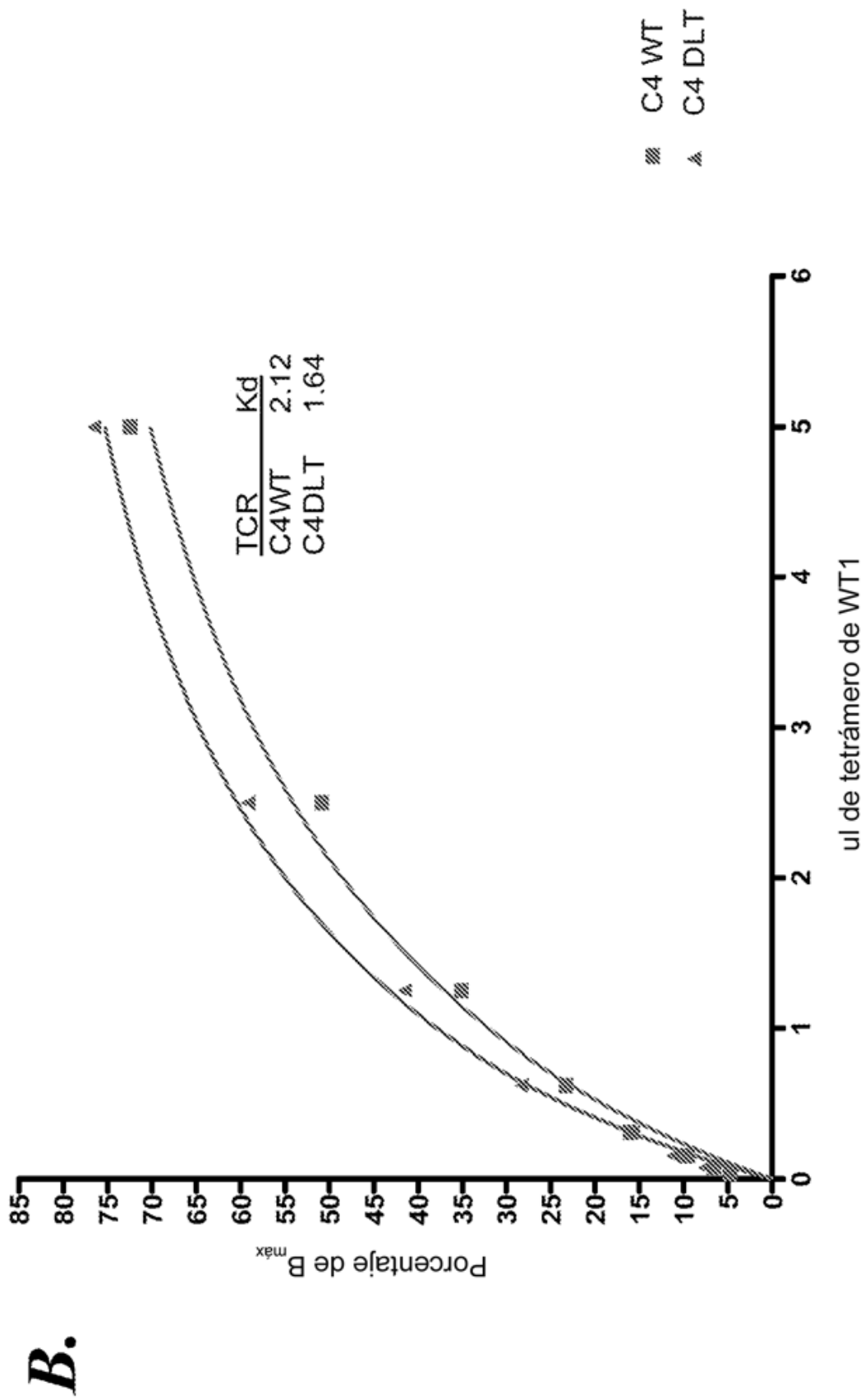
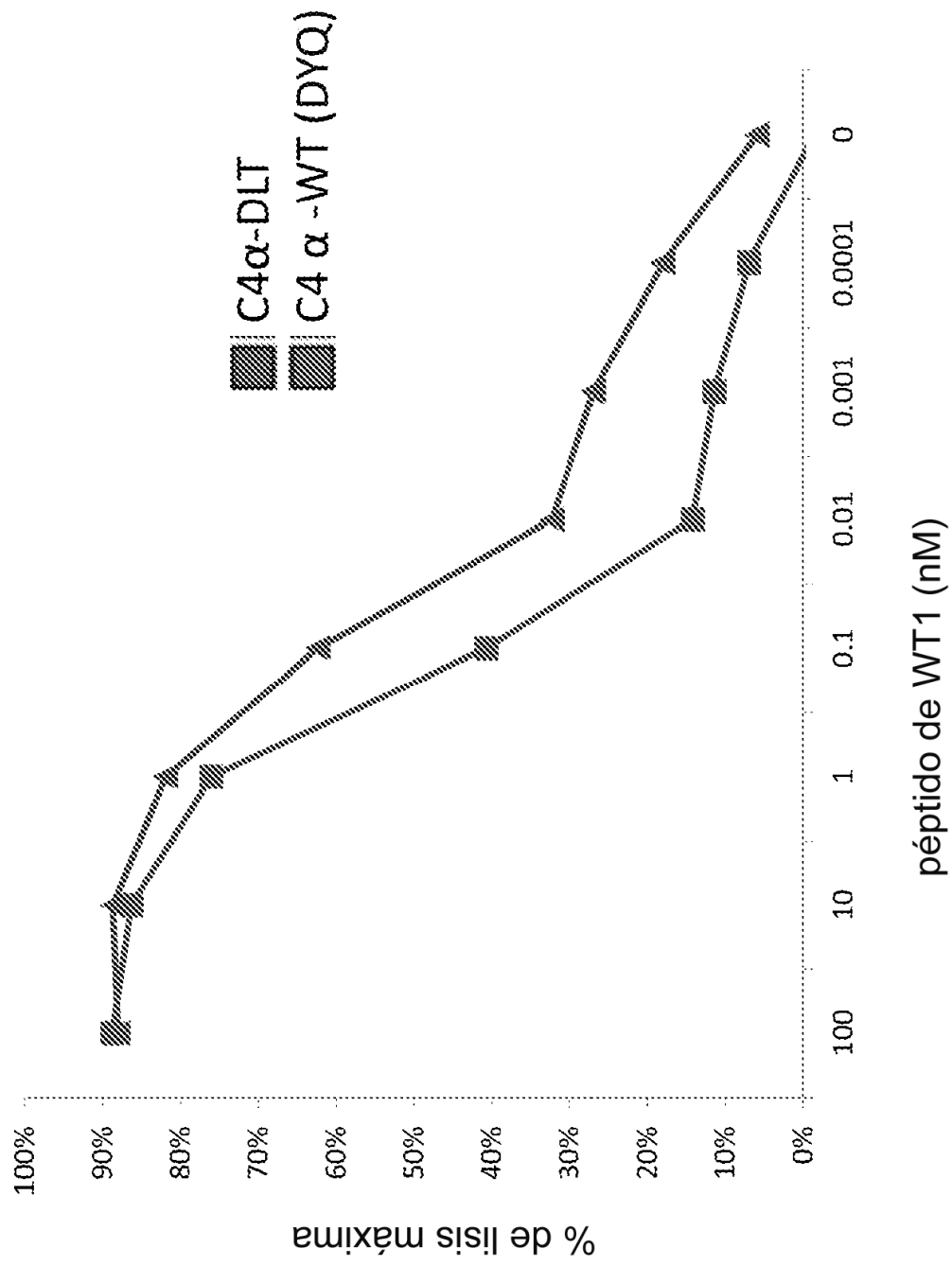


Fig. 4B

**Fig. 4C**

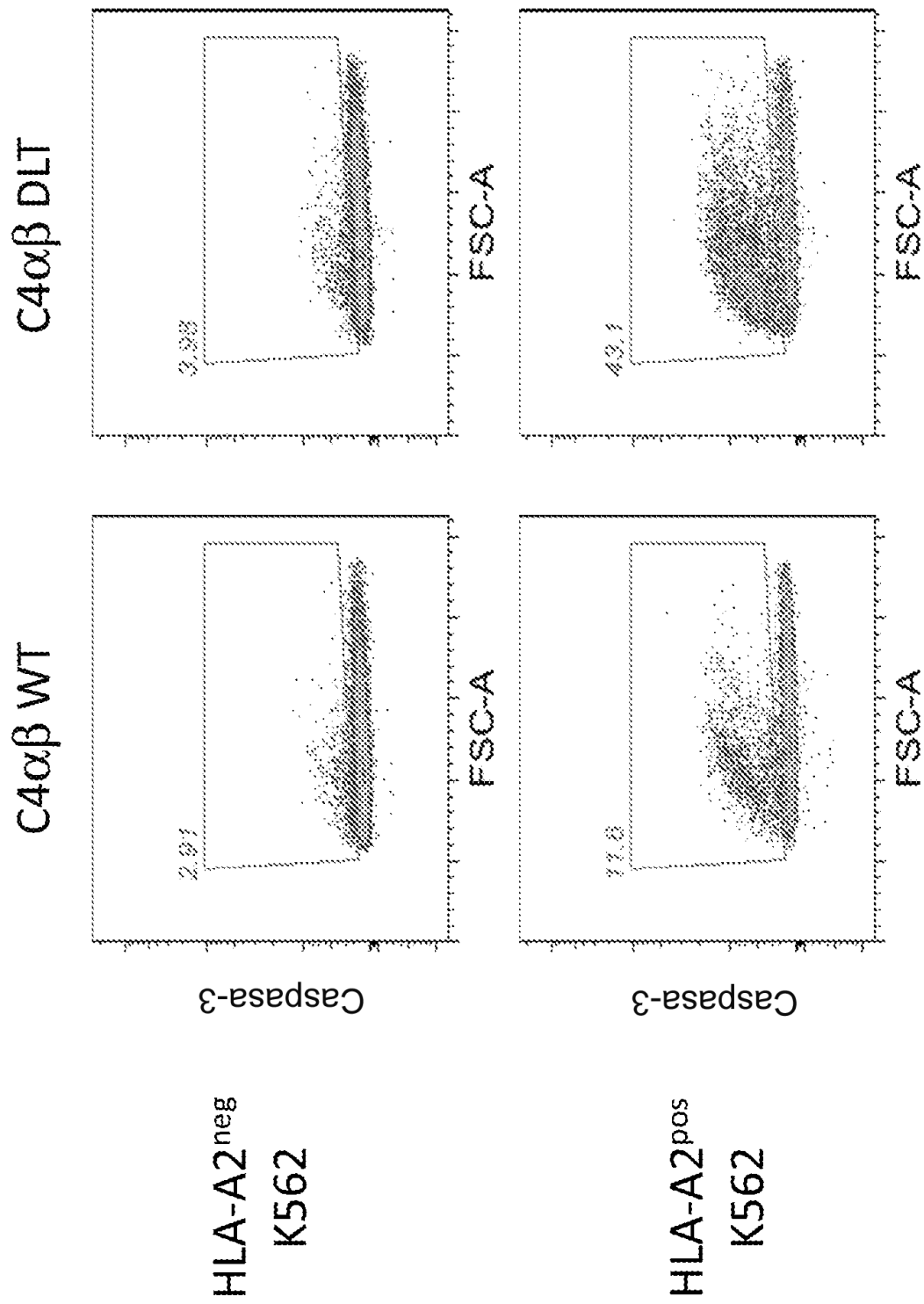


Fig. 5

A.

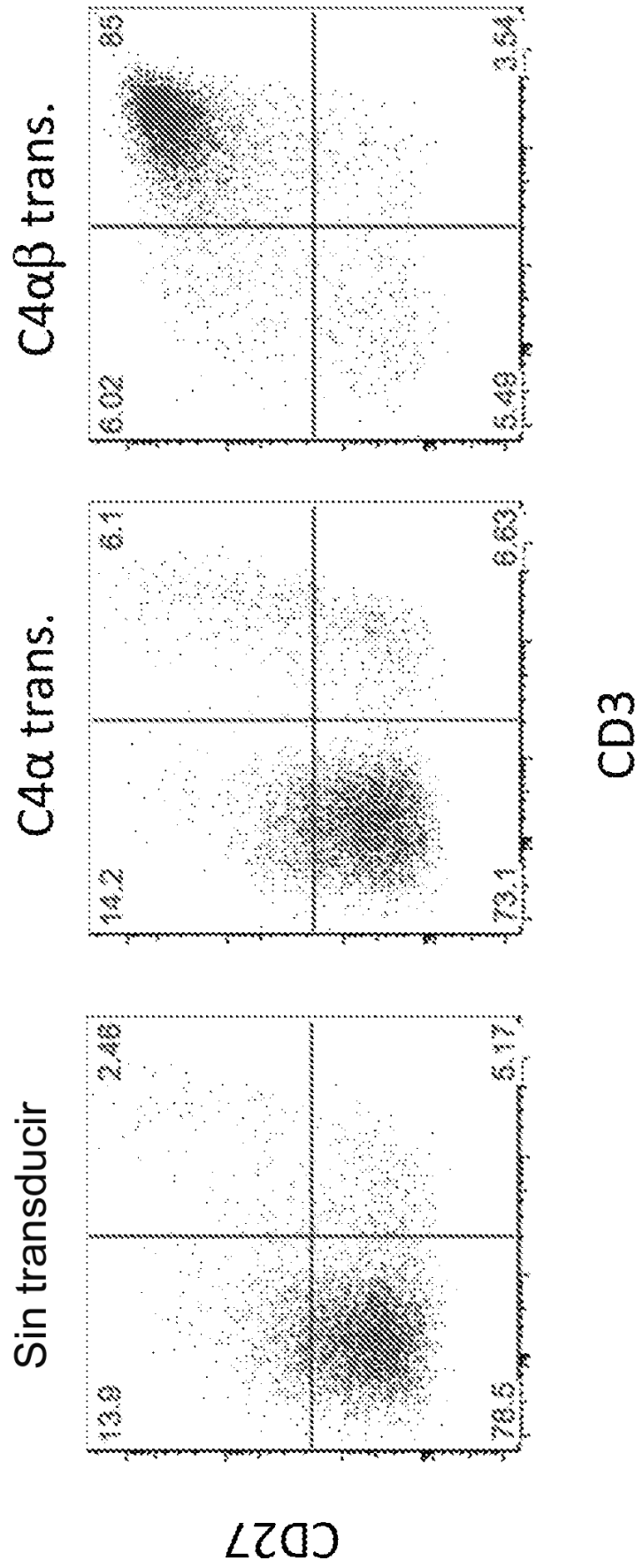


Fig. 6A

B.

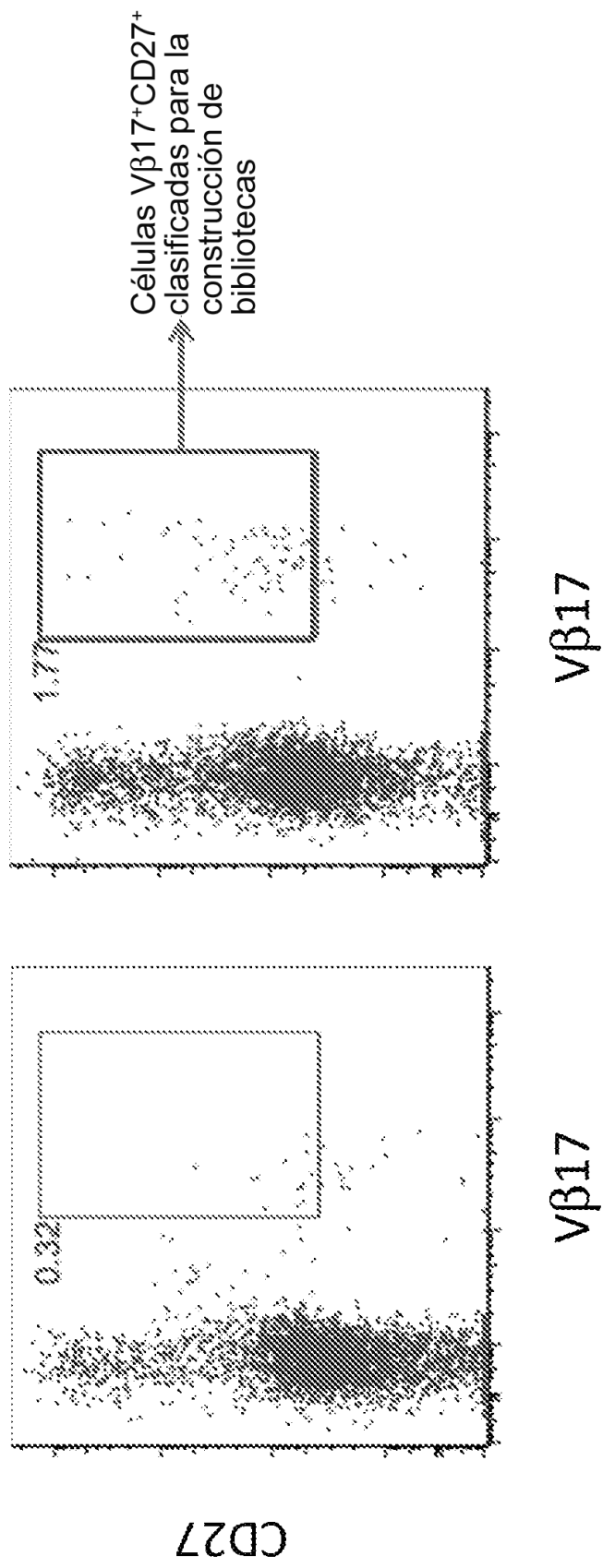


Fig. 6B

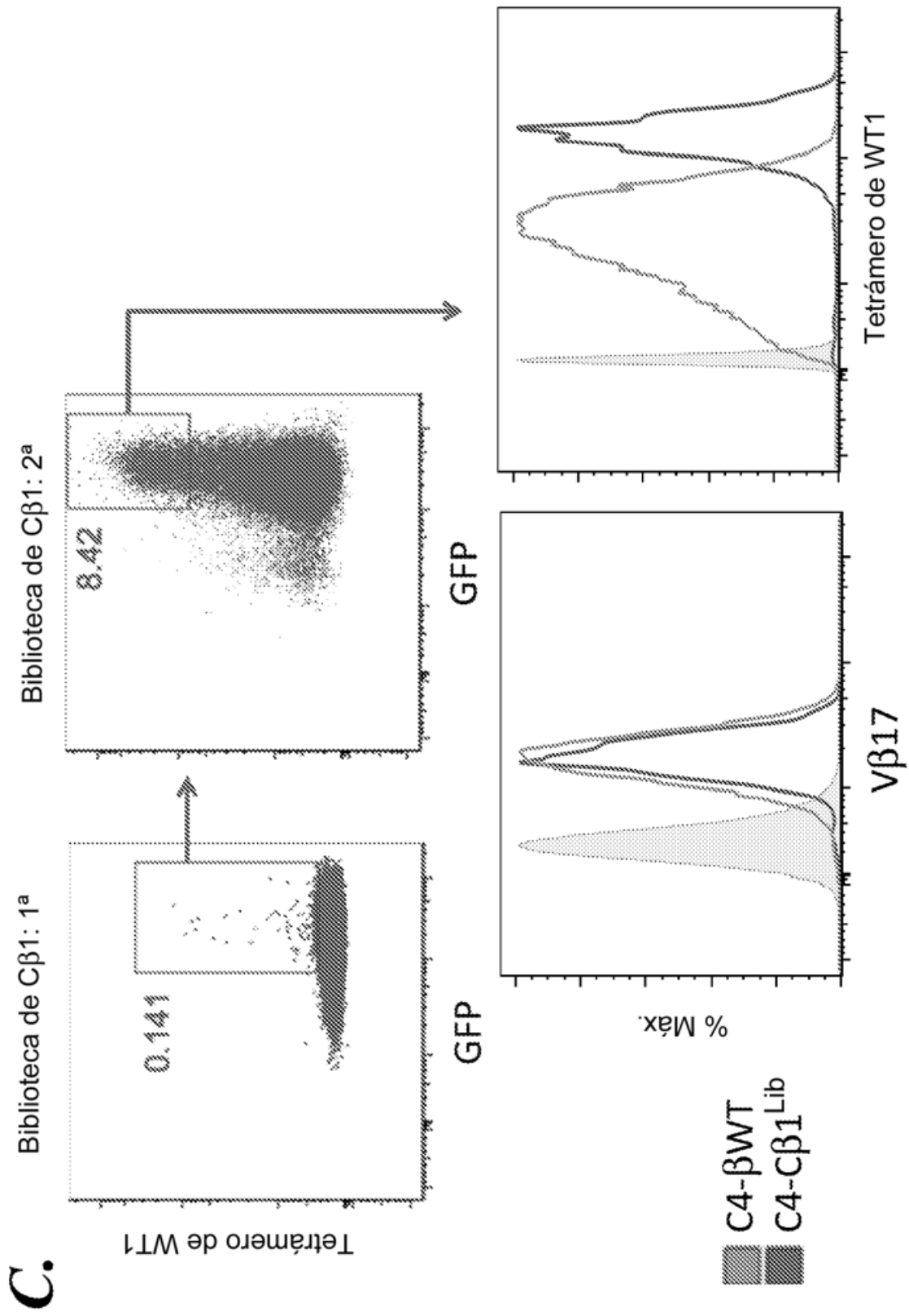
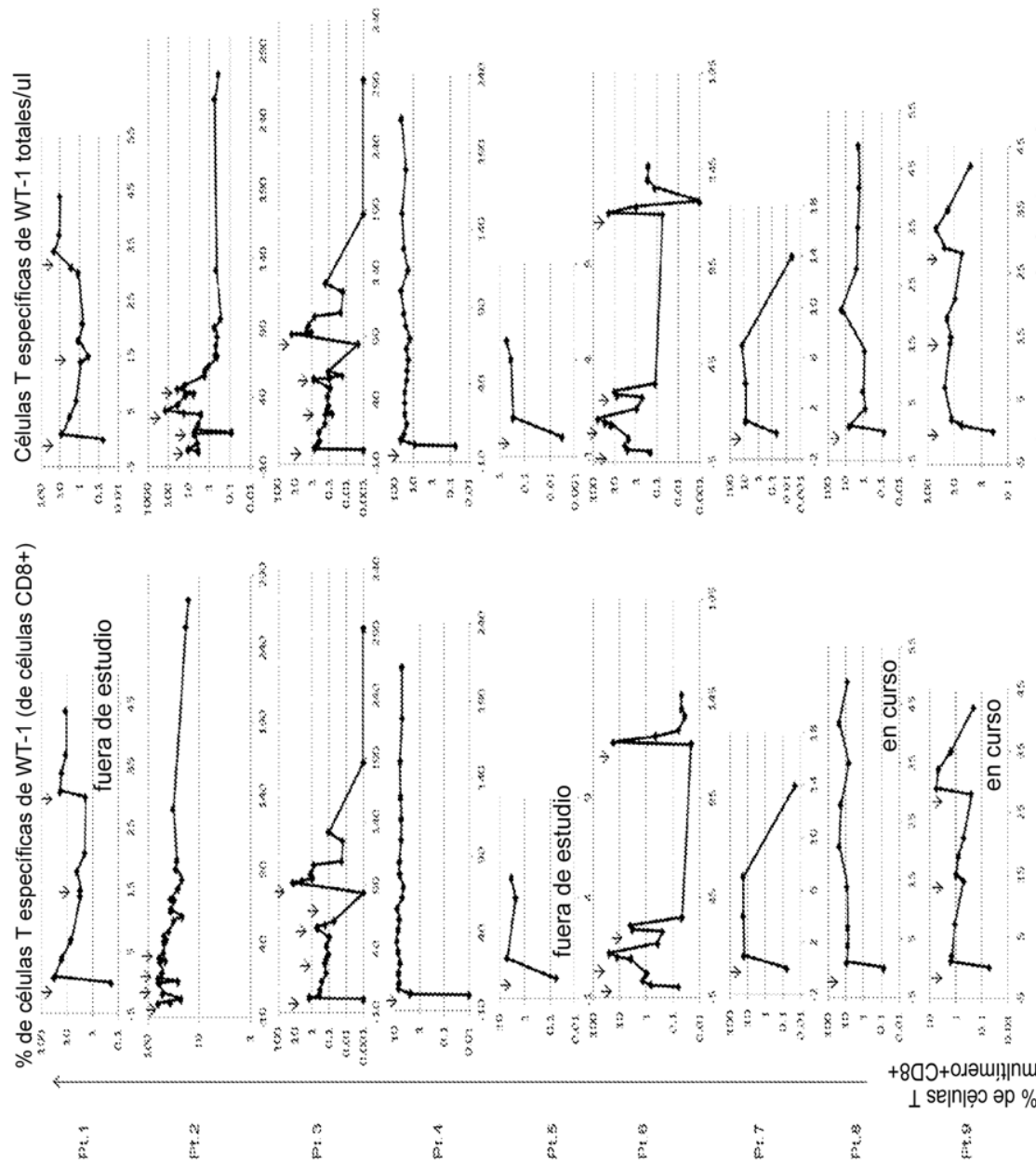


Fig. 6C

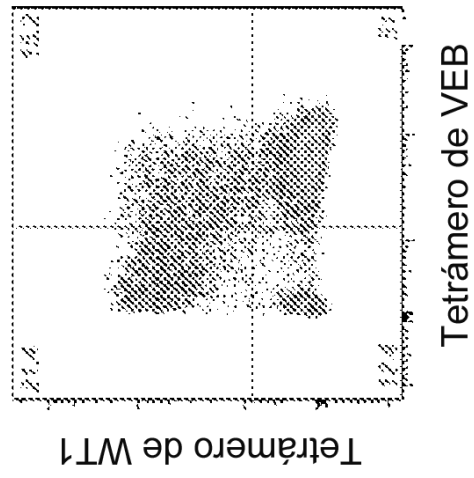


Días a partir de 1ª infusión de CTL

Días a partir de 1ª infusión de CTL

Fig. 7

A.



Día 0: Estim. con péptido de VEB

Día 1: Transducir con TCR C4

12 días

Fig. 8A

B.

Después de la
clasificación

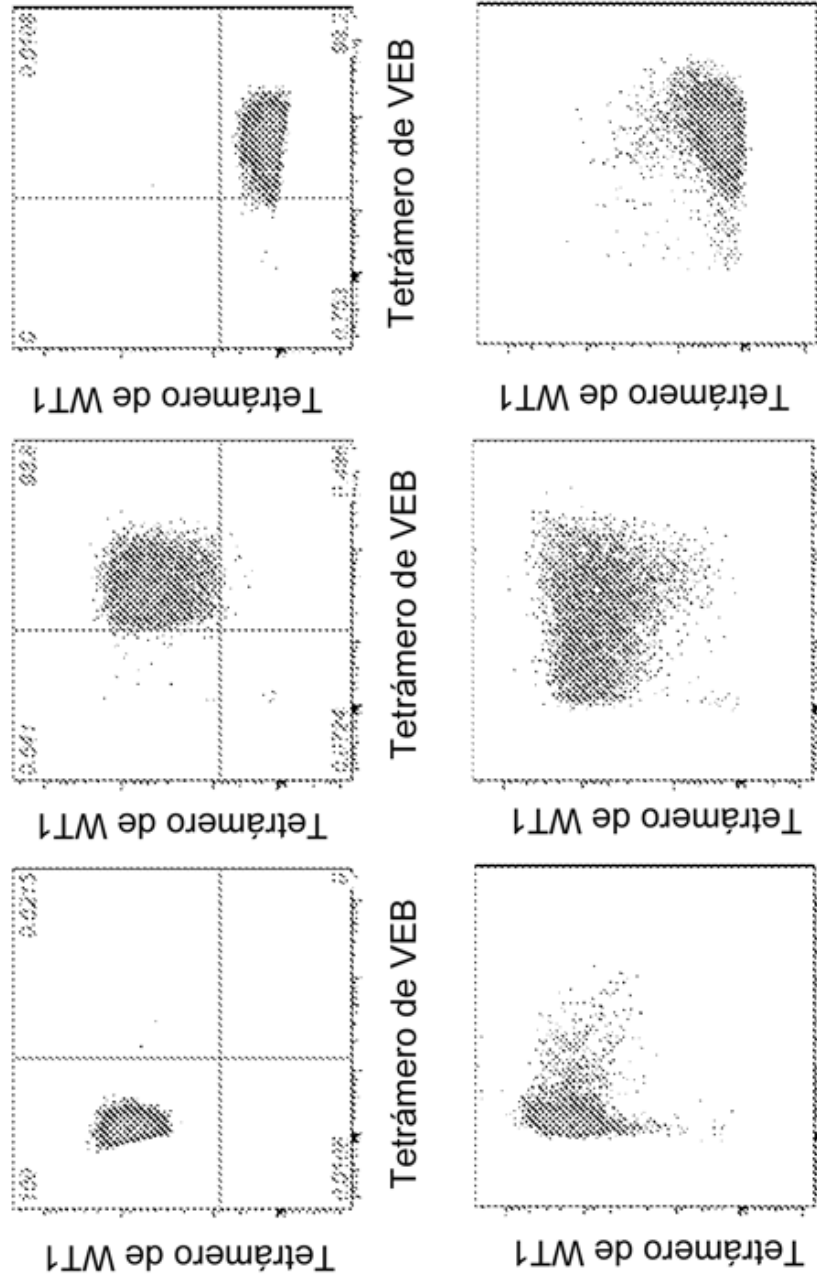


Fig. 8B

C.

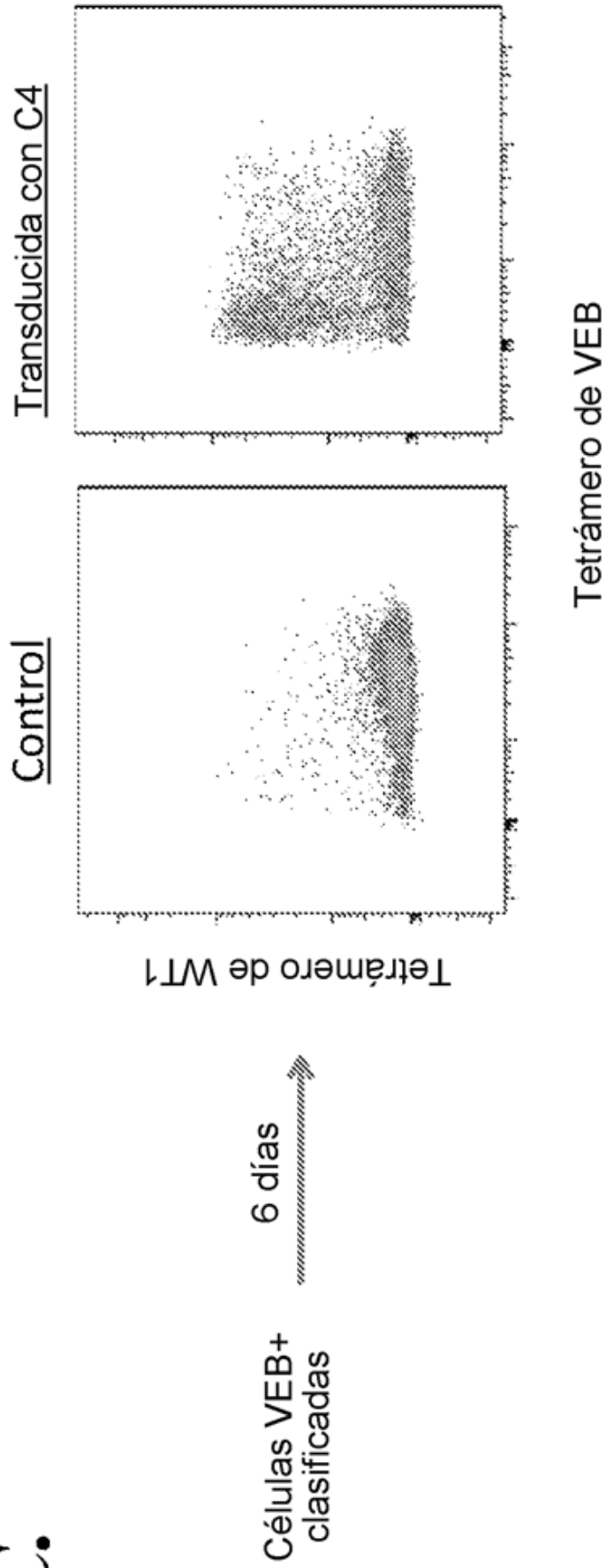


Fig. 8C