

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



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

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015** PCT/US2015/042986

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** WO16022400

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015** E 15753531 (1)

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020** EP 3177314

---

⑮ Título: **Inmunoterapia con células T específica para WT-1**

⑯ Prioridad:

**04.08.2014 US 201462033045 P**  
**21.05.2015 US 201562164783 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2021**

⑯ Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER (100.0%)**  
**1100 Fairview Avenue North**  
**Seattle, WA 98109, US**

⑯ Inventor/es:

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

⑯ 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.

20 **Antecedentes**

25 **Campo técnico**

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 epítopo 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.

30 **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.

40 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 interaccionan 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 resultados 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.

55 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; 5 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).

10 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 15 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).

20 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 25 relacionadas.

#### Breve sumario

30 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  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) 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  $\beta$  ( $V_\beta$ ) 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 35 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 un 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.

40 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.

45 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.

50 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  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en SEQ ID NO.:23, una secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en SEQ ID 55 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  $\beta$  ( $V_\beta$ ); o (b) un dominio  $V_\alpha$  de (a) y un dominio  $V_\beta$  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 60 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  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) 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  $\beta$  ( $V_\beta$ ); o 65

(b) un dominio  $V_\alpha$  y un dominio  $V_\beta$  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  $V_\alpha$  de (a) y/o un dominio  $V_\beta$  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.

5 En otro aspecto, se proporciona un receptor de células T (TCR) recombinante de alta afinidad, que comprende una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , en el que la cadena  $\alpha$  comprende un dominio  $V_\alpha$  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.

10 10 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 15 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.

20 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, 25 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 30 tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdomiosarcoma, 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

35 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-1<sup>126-134</sup> (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 titró cada clon de células T específico de WT-1 con tetrámeros de péptido de WT-1<sup>126-134</sup>/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 ( $B_{máx}$ ).

40 45 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-1<sup>126-134</sup> independientemente de CD8. Se generaron constructos TCR $\alpha$ -P2A- $\beta$  con codones optimizados que contenían las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  de los tres TCR generados a partir de los repertorios periféricos que tienen la mayor afinidad por este epítopo de WT-1 (C4, P1, P22). 50 (A) Se transdijeron estos constructos en PBMC y se evaluó el porcentaje de células teñidas con tetrámeros de WT-1<sup>126-134</sup> 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  $\beta$  transgénica respectiva en el eje X. Se calculó la población transducida como el porcentaje total de células que expresan la cadena TCR $\beta$  transgénica menos el porcentaje de células T que expresan de manera endógena esa cadena TCR $\beta$  en un cultivo sin transducir de las 55 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 $^-$ .

60 65 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  $\alpha$  y  $\beta$ , tienen las siguientes características: (1) C4 $\alpha$ -P2A- $\beta$  (C4 $\alpha$  $\beta$ WT), (2) una versión optimizada por codón de C4 $\alpha$ -P2A- $\beta$  (C4 $\alpha$  $\beta$  CO) y (3) una variante del TCR con codones optimizados en la que C4 $\beta$ , en lugar de C4 $\alpha$ , 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 $\alpha$ -P2A- $\beta$  CO y C4 $\beta$ -P2A- $\alpha$  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 transdijeron PBMC para expresar o bien el constructo C4 $\alpha$ -P2A-C4 $\beta$  de tipo natural o bien el constructo de afinidad potenciada C4 $\alpha$ -P2A-C4- $\beta$ (DLT); se aislaron las células transducidas mediante clasificación celular, se expandieron y se analizaron para determinar la tinción relativa con tetrámeros de WT-1<sup>126-134</sup> en células que expresan niveles equivalentes del TCR introducido (tal como se mide mediante tinción con V $\beta$ 17). (B) Se tiñeron PBMC clasificadas que expresan o bien el constructo C4 $\alpha$ -P2A-C4 $\beta$  de tipo natural o bien C4 $\alpha$ -P2A-C4- $\beta$ (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<sub>D</sub> usando diluciones al 50% de tetrámeros conjugados con PE a un intervalo de concentraciones. Se determinaron los valores de K<sub>D</sub> 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 $\alpha$ -P2A-C4 $\beta$  de tipo natural o bien C4 $\alpha$ -P2A-C4- $\beta$ (DLT) de afinidad potenciada con células diana cargadas con <sup>51</sup>Cr con pulsos de concentraciones decrecientes de péptido de WT-1<sup>126-134</sup> tal como se indica, y se midió la destrucción específica mediada por células T como el porcentaje de liberación máxima de cromo.

10 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 la 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 $\alpha$ -P2A-C4 $\beta$  de tipo natural o bien el TCR de C4 $\alpha$ -P2A-C4- $\beta$ (DLT) de afinidad potenciada. Se determinó la destrucción del tumor midiendo la caspasa-3 escindida en células tumorales mediante citometría de flujo.

15 25 30 35 Las figuras 6A-6C muestran los resultados de la generación y selección de bibliotecas de TCR $\beta$  seleccionadas por agonistas humanas. Se purificaron HPC CD34 $^+$  a partir de sangre de cordón umbilical, se transdijeron de manera lentiviral con o bien C4 $\alpha$ -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  $\mu$ 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 $\beta$ 17, y se clasificaron aproximadamente 2,5  $\times$  10<sup>5</sup> células V $\beta$ 17 $^+$ CD27 $^+$  para la generación de bibliotecas de TCR $\beta$ . (C) Se generaron bibliotecas de V $\beta$ 17-C $\beta$ 1 y V $\beta$ 17-C $\beta$ 2, se transdijeron en la línea de células H9.CD8-C4 $\alpha$ , seguido por la clasificación para células C4 $\alpha$ -GFP $^+$  V $\beta$ 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 $\beta$ 17 mediante citometría de flujo.

40 45 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 transdijeron 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 55 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 65 En un aspecto, la presente divulgación proporciona receptores de células T (TCR) que tienen alta afinidad por el antígeno péptídico 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,

5 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 10 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  $\alpha$  de receptor de células T (TCR) tal como se expone en SEQ ID NO.:7 u 8 y un dominio variable de cadena  $\beta$  ( $V_\beta$ ) 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 20 RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA a una tasa  $k_{off}$  reducida en comparación con un TCR que se compone de una cadena  $\alpha$  de SEQ ID NO.:5 ó 6 y una cadena  $\beta$  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 30 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.

50 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 divultan por la presente solicitud en la misma medida que si cada compuesto o grupo de compuestos se expusiera individualmente.

55 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, delecciones, 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 mieloídes tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos) y una célula progenitora linfoide (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<sup>+</sup>, una célula T CD8<sup>+</sup>, una célula T doble negativa CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, 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  $\alpha$  que atraviesa la membrana (con tres dominios  $\alpha$ ) y una microglobulina  $\beta 2$  asociada de manera no covalente. Las moléculas de CMH de clase II se componen de dos glicoproteínas transmembrana,  $\alpha$  y  $\beta$ , 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<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup>. 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<sub>CM</sub>), células T de memoria (T<sub>M</sub>) (experimentadas por antígeno y de vida larga) y células efectoras (experimentadas por antígeno, citotóxicas). Las T<sub>M</sub> pueden dividirse adicionalmente en los subconjuntos de células T de memoria central (T<sub>CM</sub>, 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<sub>EM</sub>, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con células T indiferenciadas o T<sub>CM</sub>). Las células T efectoras (T<sub>E</sub>) se refieren a linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> experimentados por antígeno que tienen expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28 y son positivos para granzima y perforina en comparación con T<sub>CM</sub>. Otras células T a modo de ejemplo incluyen células T reguladoras, tales como células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Foxp3<sup>+</sup>) y células Treg17, así como células T restringidas por Tr1, Th3, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> 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 citoplásica corta; véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3<sup>a</sup> ed., Current Biology Publications, pág. 4:33, 1997) capaz de unirse específicamente a un péptido antigeníco 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  $\alpha$  y  $\beta$  (también denominadas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , respectivamente) o cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  (también denominadas TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ , respectivamente). Como las inmunoglobulinas, la porción extracelular de las cadenas de TCR (por ejemplo, cadena  $\alpha$ , cadena  $\beta$ ) contiene dos dominios de inmunoglobulina, un dominio variable (por ejemplo, dominio variable de cadena  $\alpha$  o V $\alpha$ , dominio variable de cadena  $\beta$  o V $\beta$ ; 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<sup>a</sup> ed.) en el extremo N-terminal y un dominio constante (por ejemplo, dominio constante de cadena  $\alpha$  o C $\alpha$ , normalmente los aminoácidos 117 a 259 basándose en Kabat, dominio constante de cadena  $\beta$  o C $\beta$ , 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 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$ , dos cadenas CD3 $\epsilon$  y un homodímero de cadenas CD3 $\zeta$ . Las cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  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 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  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 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  contienen un solo motivo conservado conocido como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM, mientras que cada cadena CD3 $\zeta$  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 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$ , dos cadenas CD3 $\epsilon$ , un homodímero de cadenas CD3 $\zeta$ , una cadena TCR $\alpha$  y una cadena TCR $\beta$ .

5 Alternativamente, un complejo de TCR puede componerse de una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$ , dos cadenas CD3 $\epsilon$ , un homodímero de cadenas CD3 $\zeta$ , una cadena TCR $\gamma$  y una cadena TCR $\delta$ .

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 $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  o TCR $\delta$ ), una cadena de CD3 (es decir, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  o CD3 $\zeta$ ) o un complejo formado por dos o más cadenas de TCR o cadenas de CD3 (por ejemplo, un complejo de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , un complejo de TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ , un complejo de CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ , un complejo de CD3 $\gamma$  y CD3 $\epsilon$  o un subcomplejo de TCR de TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y dos cadenas CD3 $\epsilon$ ).

10 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 20 Los dominios de unión a modo de ejemplo incluyen regiones variables de inmunoglobulina de cadena sencilla (por ejemplo, scTCR, scFv), ectodomios 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.

25 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 une 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).

30 35 40 45 50 55 60 65 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).

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).

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

5 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 tetrameros, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando tetrameros marcados. En algunos ejemplos, la  $K_D$  aparente de un TCR se mide mediante el uso de diluciones al 50% de tetrameros 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.

10

15 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  $V_\alpha$ -L- $V_\beta$ ,  $V_\beta$ -L- $V_\alpha$ ,  $V_\alpha$ -C $\alpha$ -L- $V_\alpha$  o  $V_\alpha$ -L- $V_\beta$ -C $\beta$ , en las que  $V_\alpha$  y  $V_\beta$  son dominios variables de TCR $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, C $\alpha$  y C $\beta$  son dominios constantes de TCR $\alpha$  y  $\beta$ , 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.

20

25 "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 (8<sup>a</sup> ed.) 2011 Garland Science, NY; capítulos 6, 9 y 16). Por ejemplo, los péptidos antigenicos 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, 30 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 antigenicos 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 35 se sabe que se asocia con HLA de clase I humano (y, más específicamente, se asocia con el alelo HLA-A\*201).

40 45 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.

50 "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).

55 60 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 $\alpha$ , una cadena TCR $\beta$ , un dominio constante de TCR $\alpha$ , un dominio constante de TCR $\beta$  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%).

65 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  $\alpha$ -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, fosforoanilotioato, 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, delecciones, 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, 2<sup>a</sup> 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, cósidos, 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

5 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 biciatenario, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de células infectadas.

10 5 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.

15 10 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.

20 15 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 postraduccional, modificación postraduccional o cualquier combinación de los mismos.

25 20 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).

30 25 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.

35 30 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 $\alpha$  y TCR $\beta$ ). 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.

40 35 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

45 40

50 45

55 50

60 55

65 60

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 tradicional 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<sup>Lo</sup> Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> 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 delecionado, 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 $\alpha$  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 antigenicos 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  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) 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  $\beta$  ( $V_\beta$ ) de TCR; o (b) un dominio  $V_\alpha$  de (a) y un dominio  $V_\beta$  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 delecciones 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, delecciones 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, 3<sup>a</sup> 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).

5 La especies (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 10 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.

15 En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una proteína de unión de la superfamilia de inmunoglobulinas, que comprende (a) un dominio variable de cadena  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) 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  $\beta$  ( $V_\beta$ ) de TCR; o (b) un dominio  $V_\alpha$  y un dominio  $V_\beta$  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  $V_\alpha$  de (a) y un dominio  $V_\beta$  de (b); en la que la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo RMFPNAPYL 20 (SEQ ID NO.:16):HLA con una  $K_d$  menor de o igual a aproximadamente 5 nM. En determinados casos, el dominio  $V_\alpha$  comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, el dominio  $V_\beta$  comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9, o una combinación de los mismos.

25 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un receptor de células T (TCR) recombinante de alta 30 afinidad, que comprende una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , en el que la cadena  $\alpha$  comprende un dominio  $V_\alpha$  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  $V_\alpha$  comprende o consiste en 35 una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:1 ó 2, el dominio  $V_\beta$  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  $V_\beta$  es un alelo  $V_\beta$  17.

40 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 45 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 50 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 55 en la técnica).

60 En determinados casos, una proteína de unión o un TCR específicos de WT-1 comprende un dominio  $V_\alpha$  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  $V_\beta$  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 65 específicos de WT-1 comprende un dominio  $V_\alpha$  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  $V_\beta$  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  $V_\alpha$  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  $V_\beta$  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  $\alpha$  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  $\beta$  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  $V_\beta$  es un alelo  $V_\beta$ 17.

20 En determinados casos, una proteína de unión específica de WT-1 es un receptor de células T (TCR), un receptor de antígeno químérico o un fragmento de unión a antígeno de un TCR, pudiendo ser cualquiera de los cuales químérico, 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 químérico (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 cadena  $\alpha$  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  $\beta$  de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12 ó 13; (b) tiene una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:5 y la cadena  $\beta$  de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12; (c) tiene una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:7 y la cadena  $\beta$  de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:12; (d) tiene una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:6 y la cadena  $\beta$  de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:13; o (e) tiene una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:8 y la cadena  $\beta$  de TCR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:13.

35 En determinados casos, se proporciona una composición que comprende un 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 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 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 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.

55 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 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 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  $^{51}\text{Cr}$  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 20 "Tinción con tetrámero de CMH-peptido" 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-peptido se usa para detectar o seleccionar TCR de afinidad potenciada de la presente divulgación.

15 30 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- $\gamma$ , IL-12, IL-2 y TNF- $\beta$ , y citocinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

25 40

*Polinucleótidos que codifican para proteínas de unión específicas para péptidos antigenicos 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 inmunogén. En determinados casos, un polinucleótido que tiene codones optimizados para la expresión eficiente en una célula huésped diana.

50 55 60 65 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.

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, 3<sup>a</sup> ed., 5 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, 10 NY); Real-Time PCR: Current Technology and Applications, editado por Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 15 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., 3<sup>a</sup> 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 25 30 35 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, 6<sup>a</sup> 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, 40 45 50 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.

65 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 divultan 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 2<sup>a</sup> 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; Kyrigidis *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 astrocitico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdiosarcoma, 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.

5 "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.

10 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 15 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.

20 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 25 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 30 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 35 un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento es de aproximadamente  $10^7$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $10^8$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $5 \times 10^8$  células/m<sup>2</sup>, 40 aproximadamente  $10^9$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $5 \times 10^9$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $10^{10}$  células/m<sup>2</sup>, 45 aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup> o aproximadamente  $10^{11}$  células/m<sup>2</sup>.

50 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.

55 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.

60 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 65 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 citolíticos 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 períodos 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.

5 Una muestra biológica puede obtenerse de un sujeto para determinar la presencia y el nivel de una respuesta inmunitaria a un péptido antigenógeno 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, explant 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).

10 15 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/m<sup>2</sup> a aproximadamente  $10^{11}$  células/m<sup>2</sup>. 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.

20 25 30 35 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 una cantidad predeterminada de células recombinante o compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un portador farmacéutico apropiado.

40 45 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.

#### 45 **Ejemplos**

##### EJEMPLO 1

##### MÉTODOS

###### 50 *Constructos lentivirales*

Se generaron diversos constructos de expresión de TCR que contenían genes de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  con codones optimizados, derivados de un clón 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 $\alpha$  y TCR $\beta$  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 $\alpha$  y TCR $\beta$  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.

65 El vector pRRLSIN-C4 $\alpha$ -P2A-C4 $\beta$  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 *SalI*, 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 $\alpha$  (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 $\alpha$  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 $\alpha$ -P2A- $\beta$  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  $1 \times 10^{10}$ ) 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).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650

5655

5660

5665

5670

5675

5680

5685

5690

5695

5700

5705

5710

5715

5720

5725

5730

5735

5740

5745

5750

5755

5760

5765

5770

5775

5780

5785

5790

5795

5800

5805

5810

5815

5820

5825

5830

5835

5840

5845

5850

5855

5860

5865

5870

5875

5880

5885

5890

5895

5900

5905

5910

5915

5920

5925

<p

concentraciones tituladas de tetramero 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 $\alpha$  y TCR $\beta$  mediante RACE PCR y se realizó la secuenciación de los cuatro clones con la mayor afinidad relativa (C4, P1, P20 y P22).

5 Para caracterizar adicionalmente los TCR específicos de WT-1<sup>126-134</sup> a partir de estos clones de células T candidatos, se generaron constructos de expresión con codones optimizados para cada par de cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ . Para cada constructo, se separaron las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  por un elemento P2A para fomentar la expresión coordinadas de las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  (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 $\alpha$  y TCR $\beta$  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).

10 15 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 transdijeron TCR<sub>C4</sub>, TCR<sub>P20</sub> y TCR<sub>P22</sub> modificados con cisteína con codones optimizados en PBMC y se determinó el porcentaje de células positivas para tetramero 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 $\beta$  endógenas en el control sin transducir del porcentaje de células T específicas de V $\beta$  de TCR en las poblaciones transducidas (figura 2A).

20 25 30 Para determinar la capacidad de cada TCR para unirse a tetramero 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 tetramero de WT-1 (figura 2B). Ambos clones, TCR<sub>C4</sub> y TCR<sub>P1</sub>, se unieron al tetramero independientemente de CD8. Además, TCR<sub>C4</sub> mostró los mayores niveles de tinción con tetramero independientemente de CD8 y las PBMC transducidas con el constructo TCR<sub>C4</sub> mostraron el mayor porcentaje de células T positivas para tetramero de WT-1. Se seleccionó el clon TCR<sub>C4</sub> 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<sub>C4</sub> ESPECÍFICO DE WT-1 DE ALTA AFINIDAD

35 Tal como se describe en el ejemplo 2, se generó el constructo de expresión TCR<sub>C4</sub> de tipo natural (WT) (C4 $\alpha\beta$  WT) a partir de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  de cadena completa producidas mediante PCR 5'-RACE a partir del clon TCR<sub>C4</sub>. Este constructo incluía el ácido nucleico que codifica para la cadena TCR $\alpha$  de C4 en la posición 5', seguido por un elemento P2A, y luego el ácido nucleico que codifica para la cadena TCR $\beta$  de C4. Aunque las células T que expresan este constructo expresaron niveles similares de cadena V $\beta$ 17 transgénica en la superficie celular, la tinción con tetramero 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<sub>C4</sub> con codones optimizados (véase Scholten *et al.*, Clin. Immunol. 119:135, 2006), que mostró un aumento sustancial en la tinción con tetramero (véanse las figuras 2A y 3A).

40 45 50 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<sub>C4</sub> (véase Leisegang *et al.*, J. Mol. Med. 86:573, 2008). Las figuras 3A y 3B muestran un claro aumento de la tinción con tetramero cuando se posicionó la cadena TCR $\beta$  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.

55 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 $\alpha$  más que la proteína TCR $\beta$  cuando se ubicó en posición 5' del constructo TCR<sub>C4</sub> unido a P2A.

### EJEMPLO 4

#### ESTABILIDAD EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS DE TCR<sub>C4</sub> ESPECÍFICO DE WT-1 FUNCIONAL

60 Con el fin de estudiar la estabilidad de la expresión de TCR<sub>C4</sub> 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 tetramero de VEB. Se transdijeron las células T con el constructo de expresión TCR<sub>C4</sub> 24 horas después

5 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<sup>+</sup>, una población fácilmente detectable de células T doblemente positivas (DP) tetrámero de WT-1<sup>+</sup>/tetrámero de VEB<sup>+</sup> transducidas con TCR<sub>C4</sub>, y una población de células T tetrámero de WT-1<sup>+</sup> y tetrámero de VEB<sup>-</sup> transducidas con TCR<sub>C4</sub> 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<sub>C4</sub> (figura 8A).

10 Luego se clasificó y expandió cada una de estas poblaciones para evaluar directamente la estabilidad de la expresión de TCR<sub>C4</sub> 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 15 8B). Estos resultados indican que TCR<sub>C4</sub> puede competir fácilmente con TCR endógenos para la expresión en superficie.

20 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<sup>+</sup>, y luego se transdujo esta población purificada con el constructo TCR<sub>C4</sub> 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<sub>C4</sub> se unieron casi exclusivamente al tetrámero de WT-1, lo que indica que TCR<sub>C4</sub> es capaz de competir con la mayoría de TCR endógenos para la expresión en la superficie de células T.

## 25 EJEMPLO 5

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

30 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 $\alpha$  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 epítopo 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.

40 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.

45 Cuando se transfirió en células T CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$ ) en respuesta a concentraciones limitantes de péptido (figura 4C). 50 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 epítopo RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16) del péptido de WT-1 a C4-WT y C4-DLT cuando se transducen con HLA-A2 (figura 5).

## 55 EJEMPLO 6

### ACTIVIDAD CINÉTICA Y CITOÍTICA DE MUTANTES C4 $\alpha$ DE TCR EN COMPARACIÓN CON TCR DE C4 DE TIPO NATURAL

60 Se transdujeron HPC CD34<sup>+</sup> derivadas de sangre de cordón umbilical para expresar la cadena TCR $\alpha$  de un TCR específico de WT-1 restringido por HLA-A2 de alta afinidad (TCR<sub>C4</sub>) 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 65 con las cadenas tanto TCR $\alpha$  como TCR $\beta$  de TCR<sub>C4</sub> (C4 $\alpha\beta$ ). La mayoría de progenitores de células T  $\gamma\delta$  humanas

expresan CD4 y CD8 durante el desarrollo en OP9-DL1 (Van Coppernolle *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 Coppernolle *et al.*, J. Immunol. 183:4859, 2009), se usaron la expresión de CD27 y la cadena TCR $\beta$  de V $\beta$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\beta$ 17 parental (figura 6A). Se recogieron sólo células V $\beta$ 17 $^+$ CD27 $^+$  para la construcción de bibliotecas de TCR $\beta$  el día 34 de cultivo (figura 6B).

Se transdujeron las bibliotecas de V $\beta$ 17-C $\beta$ 1 y V $\beta$ 17-C $\beta$ 2 en células H9.CD8-C4 $\alpha$  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 $\beta$ 17-C $\beta$ 1 mostraron un intervalo de reactividad de tetrámeros, lo que indica que las múltiples cadenas TCR $\beta$  presentes en la población clasificada con V $\beta$ 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 $\alpha$  que expresan la cadena C4 $\beta$  parental. Si bien ambas poblaciones de células transducidas expresaron niveles similares de V $\beta$ 17, se observó una tinción con tetrámero sustancialmente mayor para las células tetrámero $^h$  enriquecidas a partir de la biblioteca de V $\beta$ 17-C $\beta$ 1 (figura 6C). En algún caso, estas cadenas TCR $\beta$  derivadas de la biblioteca de C $\beta$ 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 $^b$ D $^b$ DL1 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 $^b$ DL1) y se transdujo por separado con H-2K $^b$ . Se transdujo adicionalmente la línea de células OP9-K $^b$ D $^b$ DL1-WT-1 para expresar WT-1 murina. Se generó la línea de células OP9-A2-DL1 mediante la transducción de células OP9-K $^b$ DL1 con un constructo retroviral que codifica para HLA-A2-IRES- $\beta$ 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 $^{\text{L}}/3$ D-PYY $\alpha$  mediante transducción retroviral de la línea de células 58 $^{\text{L}}$  deficiente en TCR $\alpha$ /TCR $\beta$  con Mig2-3D-PYY $\alpha$ . Se generó la línea de células H9.CD8-C4 $\alpha$  mediante transducción lentiviral de la línea de células T H9 humana con un constructo CD8 $\alpha$ -P2A- $\beta$  seguido por transducción lentiviral para expresar C4 $\alpha$ -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 immunoterapéutica 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 epítopo WT-1 $^{126-134}$  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 ningunos de los pacientes reflejara actividad de las células T infundidas.

5 Tres pacientes que se trajeron 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).

10

15 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<sup>+</sup> 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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 129

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena C4 alfa-DLT

10

&lt;400&gt;

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

15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante de cadena (C4alfa, P1, P18)

&lt;400&gt; 3

25

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 141

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante (T177C, T185C, T184C) de cadena (C4alfa, P1, P18)

10

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 270

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4alfa

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 270

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4alfa (T177C)

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 270

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4alfa-DLT

10

&lt;400&gt; 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

5 <210> 8

<211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 131

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena C4beta

10

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 179

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta

10

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 179

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante (S188C, S191C, S190C, S186C) de cadena (C4, P1, P15, P22)beta

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 310

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4beta

10

&lt;400&gt; 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		

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 310

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4beta (S188C)

10 &lt;400&gt; 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  
 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  
 305 310

5 <210> 14  
 <211> 602  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> C4beta (S188C)-P2A-C4alpha (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	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 Tyr Gln	
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 Leu Lys Val Ala	Gly Phe Asn	
580 585	590	
Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
595 600		

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 602

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C4beta (S188C)-P2A-C4alpha-DLT (T177C)

10

&lt;400&gt; 15

## ES 2 841 274 T3

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  
 385 390 395 400  
 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

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Antígeno peptídico de WT-1

10 &lt;400&gt; 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 *Thosea asigna* (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  
 130

10

<210> 22  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <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

25 <210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de C4alpha  
 <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 C4alpha  
 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 C4alpha (DYQ)  
 <400> 25  
**Cys Ala Ala Thr Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp**  
 30        1                5                        10  
 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> CDR3 de C4alpha (DLT)  
 <400> 26  
 40 <210> 27  
**Cys Ala Ala Thr Glu Asp Leu Thr Leu Ile Trp**  
 45        1                5                        10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 de C4beta  
 50 <400> 27  
**Leu Asn His Asp Ala**  
 55        1                5  
 <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 P1alpha  
 <400> 30  
**Thr Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr**  
 30      1                5  
 <210> 31  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35      <220>  
 <223> CDR2 de P1alpha  
 <400> 31  
 40      **Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln**  
 1                5  
 <210> 32  
 <211> 16  
 45      <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR3 de P1alpha  
 50      <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

20 <210> 35  
 <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 P15alpha

<400> 36

**Asn Thr Ala Phe Asp Tyr**  
 40        1                5

<210> 37  
 <211> 7  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR2 de P15alpha

50 <400> 37

**Ile Arg Pro Asp Val Ser Glu**  
 55        1                5

<210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> CDR3 de P15alpha  
 <400> 38

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

20 <210> 40  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <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						

45 <210> 42  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR1 de P18alpha

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  
 30 1 5  
 <210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> CD2 de P18beta  
 <400> 46  
 40 Phe Asn Asn Asn Val Pro  
 1 5  
 <210> 47  
 <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  
 55 1 5 10  
 <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>

50 <223> CDR1 de (P20, P22)beta

<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

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <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

5 <220>  
 <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

25 <210> 59  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dominio variable de cadena P20alfa

5 <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 P22alpha

15

<400> 60

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

20

<210> 61  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> dominio constante de cadena (P15, P20)alpha

<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

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 141

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena (P15, P20)alfa

10 &lt;400&gt; 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 &lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante de cadena P22alfa

&lt;400&gt; 63

25

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

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 141

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio constante (T180C) de cadena P22alfa

10

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 134

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena P1beta

&lt;400&gt; 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  
 50 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

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 133

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena P15beta

10

&lt;400&gt; 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  
 50 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

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena P18beta

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 128

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena P20beta

10

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena P22beta

&lt;400&gt; 69

25

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  
 25 1 5 10 15

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>

<223> P1alpha (T185C)-P2A-P1beta

10 <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
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
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
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
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		

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 617

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P15alpha (T190C)-P2A-P15beta (S190C)

10 &lt;400&gt; 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

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															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
								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

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 599

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P20alpha (T179C)-P2A-P20beta (S185C)

10 &lt;400&gt; 75

ES 2 841 274 T3

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		
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			

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 603

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

# ES 2 841 274 T3

<223> P22alpha (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 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
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	

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 387

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena de C4alfa WT

10

&lt;400&gt; 77

atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga	60
gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg aaggagacag cgctgttatac	120
aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga	180
aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaatgtgg gcgaaaagaa agaccaacga	240
attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa	300
cctgaagact cggctgtcta cttctgtca gcgaccgaag actatcagtt aatctggggc	360
gctgggacca agctaattat aaagcca	387

15

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena C4alfa - con codones optimizados

&lt;400&gt; 78

atgaccagca tccggggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggaccc cgtcaacggc	60
gagaacgtgg aacagcaccc cagcaccctg agcgtgcagg aaggcgacag cggcgatc	120
aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttccctt ggtacaagca ggaactgggc	180
aagcgcccc agctgatcat cgacatccgg tccaaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg	240
atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag	300
cccgaggact ccgcccgtgtc cttctgtgcc gccaccgagg attaccagct gatctggggc	360
gccccgacca agctgatcat taagccc	387

25

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; ADN

30

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio variable de cadena C4alfa-DLT

35

&lt;400&gt; 79

atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga	60
gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttac	120
aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgg	180
aaaagaccc agcttattat agacattcg tcaaatgtgg gcgaaaagaa agaccaacga	240
attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa	300
cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcgaccgaag acctgacggtt 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 gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc	60
gagaacgtgg aacagcaccc cagcacccctg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc	120
aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttccctt ggtacaagca ggaactgggc	180
aagcggccccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg	240
atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag	300
cccgaggact cgcgcgtgtt cttctgtgcc gccaccgagg atctgacgct gatctgggg	360
gcccgcacca agctgatcat taagccc	387
15 <210> 81	
<211> 426	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
20 <223> dominio constante de cadena C4alfa WT	
<400> 81	
25 gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag	60
tctgtctgcc tattcaccga ttttatttct caaaacaaatg tgcacaaaag taaggattct	120
gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta gacatgaggct tcatggactt caagagcaac	180
agtgtgtgg cctggagccaa caaatctgac tttgcattgtg caaacgcctt caacaacacg	240
attattccag aagacacccctt cttcccccagc ccagaaaggat cctgtatgtt caagctggc	300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc	360
cgaatccccc tcctgaaagt ggccgggtt aatctgctca tgacgctgctg gctgtgggtcc	420
agctga	426
<210> 82	
<211> 426	
30 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
35 <223> dominio constante de cadena C4alfa - con codones optimizados	
<400> 82	
gacatccaga accccgaccc tgccgtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag	60
agcgtgtgcc tgccgtgtac cttcgacacg cagaccaacg tgcgtgttcaaggacacg	120
gacgtgtaca tcaccgataa gaccgtgtcg gacatgcggc gcatggactt caagagcaac	180
agcgccgtgg cctggtccaa caagagcgac ttgcgtgtcg ccaacgcctt caacaacacg	240
attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgtgttcaagctgggt	300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacccgt aacttccaga acctcagcgt gatcggttc	360
cggatccccc tgctgaaagggt ggccgggtt aacctgctga tgaccctgctg gctgtgggtcc	420
agctga	426

5 <210> 83  
 <211> 426  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> dominio constante de cadena C4alfa - modificación con Cys  
 15 <400> 83  
 gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60  
 tctgtctgcc tattcaccga ttttattct caaacaatg tgcacaaag taaggattct 120  
 gatgtgtata tcacagacaa atgcgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180  
 atgtctgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcattgtg caaacgcctt caacaacagc 240  
 attattccag aagacacaccc ttccccagc ccagaaagtt cctgtatgt caagctggtc 300  
 gagaaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aacttccaaa acctgtcagt gattgggttc 360  
 cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggtt aatctgctca tgacgctgctg gctgtggtcc 420  
 agctga 426  
 20 <210> 84  
 <211> 426  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> dominio constante de cadena C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados  
 <400> 84  
 gacatccaga accccgaccc tgccgtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60  
 agcgtgtgcc tgttcaccga ctgcacacgc cagaccaacg tgcacccagag caaggacacgc 120  
 gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcggc gcatggactt caagagcaac 180  
 agcgcgtgg cctggtccaa caagagcgcac ttgcctgctg ccaacgcctt caacaacagc 240  
 attatccccg aggacacatt ttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg 300  
 gaaaaagagct tcgagacaga caccacccgt aacttccaga acctcagcgt gatcggcttc 360  
 cggatcctgc tgctgaaagt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgctg gctgtggtcc 420  
 agctga 426  
 30 <210> 85  
 <211> 813  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> cadena C4alfa WT  
 <400> 85  
 atgacatcca ttgcgtgtt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgg 60  
 gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgcagg agggagacag cgctgttata 120  
 aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgg 180  
 aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaattgtgg gcgaaaagaa agaccaacga 240  
 attgcgttta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300  
 cctgaagact cggctgtcta ttctgtca ggcggcaag actatcgtt aatctggggc 360  
 gctgggacca agctaattat aaagccagat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag 420  
 ctgagagact ctaaatccag tgacaaggat gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa 480  
 acaaattgtgt cacaaagtaa ggattctgtat gtgtatataa cagacaaaac tggcttagac 540  
 atgagggtcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggct ggagcaacaa atctgacttt 600  
 gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt ccccagccca 660  
 gaaagttccct gtgatgtcaa gctggctgag aaaagcttt aaacagatac gaacctaaac 720  
 tttcaaaacc tgtcagtgtat tgggttccga atcctcctcc tgaaagtggc cgggttaat 780  
 ctgctcatga cgctgcccgt gtggccacg tga 813

5        <210> 86  
 <211> 813  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cadena C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados  
 10      <400> 86

atgaccagca	tccggccgt	gttcatctc	ctgtggctgc	agctggacct	cgtcaacggc	60
gagaacgtgg	aacagcaccc	cagcaccctg	agcgtcagg	aaggcgacag	cgccgtcatc	120
aagtgcacct	acagcgactc	cgccagcaac	tacttcccct	ggtacaagca	ggaactgggc	180
aagcggccccc	agctgatcat	cgacatccgg	tccaaacgtgg	gcgagaagaa	ggaccagcgg	240
atcgccgtga	ccctgaacaa	gaccgccaag	cacttcagcc	tgcacatcac	cgagacacag	300
cccgaggact	ccgcccgtgt	cttctgtgcc	gccaccgagg	actaccagct	gatctgggg	360
gccggcacca	agctgatcat	taagcccgac	atccagaacc	ccgaccctgc	cgtgtaccag	420
ctgcgggaca	gcaagagcag	cgacaagagc	gtgtgcctgt	tcaccgactt	cgacagccag	480
accaacgtgt	cccagagcaa	ggacagcgac	gtgtacatca	ccgataagtg	cgtgctggac	540
atgcggagca	tggacttcaa	gagcaacacgc	gccgtggcct	ggtccaacaa	gagcacttc	600
gcctgcgcca	acgccttcaa	caacagcatt	atccccgagg	acacattctt	ccaaagcccc	660
gagagcagct	gcgacgtgaa	gtgggtggaa	aagagcttcg	agacagacac	caacctgaac	720
ttccagaacc	tcagcgtgat	cggttcggg	atcctgctgc	tgaagggtggc	cggcttcaac	780
ctgctgatga	ccctgcccgt	gtggtccagc	tga			813

15      <210> 87  
 <211> 813  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20      <223> cadena C4alfa-DLT - modificación con Cys, con codones optimizados  
 <400> 87

atgaccagca	tccggccgt	gttcatctc	ctgtggctgc	agctggacct	cgtcaacggc	60
gagaacgtgg	aacagcaccc	cagcaccctg	agcgtcagg	aaggcgacag	cgccgtcatc	120
aagtgcacct	acagcgactc	cgccagcaac	tacttcccct	ggtacaagca	ggaactgggc	180
aagcggccccc	agctgatcat	cgacatccgg	tccaaacgtgg	gcgagaagaa	ggaccagcgg	240
atcgccgtga	ccctgaacaa	gaccgccaag	cacttcagcc	tgcacatcac	cgagacacag	300
cccgaggact	ccgcccgtgt	cttctgtgcc	gccaccgagg	atctgacgct	gatctgggg	360
gccggcacca	agctgatcat	taagcccgac	atccagaacc	ccgaccctgc	cgtgtaccag	420
ctgcgggaca	gcaagagcag	cgacaagagc	gtgtgcctgt	tcaccgactt	cgacagccag	480
accaacgtgt	cccagagcaa	ggacagcgac	gtgtacatca	ccgataagtg	cgtgctggac	540
atgcggagca	tggacttcaa	gagcaacacgc	gccgtggcct	ggtccaacaa	gagcacttc	600
gcctgcgcca	acgccttcaa	caacagcatt	atccccgagg	acacattctt	ccaaagcccc	660
gagagcagct	gcgacgtgaa	gtgggtggaa	aagagcttcg	agacagacac	caacctgaac	720
ttccagaacc	tcagcgtgat	cggttcggg	atcctgctgc	tgaagggtggc	cggcttcaac	780
ctgctgatga	ccctgcccgt	gtggtccagc	tga			813

25      <210> 88  
 <211> 393  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30      <220>  
 <223> dominio variable de cadena C4beta WT  
 <400> 88  
 35

atgagcaacc	aggtgctctg	ctgtgtggtc	ctttgtttcc	tgggagcaaa	caccgtggat	60	
ggtggaatca	ctcagtcccc	aaagtacctg	ttcagaaagg	aaggacagaa	tgtgaccctg	120	
agttgtgaac	agaatttcaa	ccacgatgcc	atgtactgg	accgacagga	cccaggggcaa	180	
gggctgagat	tgatctacta	ctcacagata	gtaaatgact	ttcagaaagg	agatatacgct	240	
gaagggtaca	gcgtctctcg	ggagaagaag	gaatccttc	ctctcactgt	gacatcggcc	300	
caaaaagaacc	cgacagctt	ctatctctgt	gccagtagcc	ccggggccct	ctacgagcag	360	
	tacttcgggc	cgggcaccag	gctcacggtc	aca		393	
	<210> 89						
	<211> 393						
5	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> dominio variable de cadena C4beta - con codones optimizados						
10	<400> 89						
	atgagcaacc	aggtgctgtg	ctgcgtggtg	ctgtgtttcc	tgggcgccaa	caccgtggac	60
	ggcggcatca	cccagagccc	caagtacctg	ttccggaaag	agggccagaa	cgtcaccctg	120
	agctgcgagc	agaacctgaa	ccacgacgcc	atgtactgg	acagacagga	ccccggacag	180
	ggcctgcggc	tgatctacta	cagccagatc	gtgaacgact	tccagaaggg	agatatcgcc	240
	gagggtaca	gcgtgtccag	agagaagaaa	gagtccttc	cactgaccgt	gaccagcgcc	300
	cagaagaacc	ccaccgcctt	ctacctgtgc	gccagctctc	ctggcgcctc	gtacgagcag	360
	tacttcggcc	ctggcaccctg	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	cccaaaaaggc	cacactgtgt	tgcctggcca	caggcttcta	ccccgaccac	120
	gtggagctga	gctgggtgggt	gaatggaaag	gagggtcaca	gtggggtcag	cacagacccg	180
	cagccctca	aggagcagcc	cgccctcaat	gactccagat	actgcctgag	cagccgcctg	240
	agggtctcgg	ccaccttctg	gcagaaccccc	cgcaaccact	tccgctgtca	agtccagttc	300
	taaaaaatctt	cgggaaatga	cgagtggacc	caggatagg	ccaaacctgt	cacccagatc	360
	gtcagcgccg	aggcctgggg	tagacagac	tgtggcttca	cctccgagtc	ttaccagcaa	420
	ggggtcctgt	ctgccaccat	cctctatgag	atctgctag	ggaaggccac	cttgtatgcc	480
25	gtgtgtgtca	gtgcctctgt	gctgtatggcc	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 agaaggcagag 60  
 atctcccaca cccaaaaggc cacactgggt tgccctggcca caggcttcta ccccgaccac 120  
 gtggagctga gctgggggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagacccc 180  
 cagcccccta aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg 240  
 agggtctcg ccacccctgt gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300  
 tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaaccctgt cacccagatc 360  
 gtcagcgccg aggccctgggg tagagcagac tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa 420  
 ggggtcctgt ctgccaccat cctctatagag atcttgcttag ggaaggccac ctgttatgcc 480  
 gtgctggtca gtgcctcggt gctgatggcc atggtcaaga gaaaggattc cagaggctag 540

<210> 92  
 <211> 540  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 92

gaggacctga agaacgtgtt ccccccagag gtggccgtgt tcgagccctag cgaggccgag 60  
 atcagccaca cccagaaaagc caccctcggt tgccctggcca ccggctttta ccccgaccac 120  
 gtggactgt ctgggggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtcag caccgacccc 180  
 cagcccccta aagagcagcc cgccctgaac gacagccggt actgtctgag cagcagactg 240  
 agagtgtccg ccacccctgt gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300  
 tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggaccggg ccaagccctgt gacccagatc 360  
 gtgtctgtgt aggccctgggg cagagccgat tgccgcttca ccagcgagag ctaccagca 420  
 ggcgtctgtga ggcaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac cctgtacgccc 480  
 15 gtgctggtgt ccgcctcggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggacag cccgggctga 540

<210> 93  
 <211> 540  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> dominio constante de cadena (C4, P1, P15, P22)beta - modificación con Cys, con codones optimizados

<400> 93

25 gaggacctga agaacgtgtt ccccccagag gtggccgtgt tcgagccctag cgaggccgag 60  
 atcagccaca cccagaaaagc caccctcggt tgccctggcca ccggctttta ccccgaccac 120  
 gtggactgt ctgggggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtcag caccgacccc 180  
 cagcccccta aagagcagcc cgccctgaac gacagccggt actgtctgag cagcagactg 240  
 agagtgtccg ccacccctgt gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300  
 tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggaccggg ccaagccctgt gacccagatc 360  
 gtgtctgtgt aggccctgggg cagagccgat tgccgcttca ccagcgagag ctaccagca 420  
 ggcgtctgtga ggcaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac cctgtacgccc 480  
 gtgctggtgt ccgcctcggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggacag cccgggctga 540

<210> 94  
 <211> 933  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena C4beta WT

35 <400> 94

atgagcaacc	aggtgtctg	ctgtgtggc	ctttgtttcc	tgggagcaaa	caccgtggat	60
ggtgaatca	ctcagtcccc	aaagtacctg	ttcagaaagg	aaggacagaa	tgtgaccctg	120
agttgtgaac	agaatttgaa	ccacgatgcc	atgtactgg	accgacagga	cccaggcaca	180
gggctgagat	tgatctacta	ctcacagata	gtaaatgact	ttcagaaagg	agatatacg	240
gaagggtaca	gcgtctctcg	ggagaagaag	gaatccttc	ctctcactgt	gacatcggcc	300
caaaaagaacc	cgacagctt	ctatctctgt	gccagtagcc	ccggggccct	ctacgagcag	360
tacttcgggc	cgggcaccag	gctcacggc	acagaggacc	tgaaaaacgt	gttcccaccc	420
gagggtcgctg	tgtttgagcc	atcagaagca	gagatctccc	acacccaaaa	ggccacactg	480
gtgtgcctgg	ccacaggctt	ctacccgac	cacgtggagc	tgagctgg	gttgaatgg	540
aaggaggtgc	acagtgggt	cagcacagac	cccgagcccc	tcaaggagca	gcccgccctc	600
aatgactcca	gatactgcct	gagcagccgc	ctgagggtct	cggccacctt	ctggcagaac	660
ccccgcaacc	acttcgctg	tcaagtccag	ttctacggc	tctcggagaa	tgacgagtgg	720
acccaggata	ggccaaacc	tgtcaccagg	atcgtcagcg	ccgaggcctg	ggtagagca	780
gactgtggct	tcacccctcg	gtcttaccag	caaggggtcc	tgtctccac	catcctctat	840
gagatcttgc	tagggaaaggc	cacccctgtat	gccgtgtgg	tcagtccct	cgtgctgatg	900
gccccatggtca	agagaaagga	ttccagaggc	tag			933

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 933

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cadena C4beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10 &lt;400&gt; 95

atgagcaacc	aggtgtgtg	ctgcgtggtg	ctgtgtttcc	tgggcgc当地	caccgtggac	60
ggcggcatca	cccagagccc	caagtacctg	ttccggaaag	agggccagaa	cgtcaccctg	120
agctgcgagc	agaacctgaa	ccacgacgcc	atgtactgg	acagacagga	ccccggacag	180
ggcctgcggc	tgatctacta	cagccagatc	gtgaacgact	tccagaaggg	agatatacgcc	240
gagggtctaca	gcgtgtccag	agagaagaaa	gagtcctcc	cactgaccgt	gaccagcgcc	300
cagaagaacc	ccaccgcctt	ctacctgtgc	gccagctctc	ctggcgc当地	gtacgagcag	360
tacttcggcc	ctggcaccagg	gctgacagt	accgaggacc	tgaagaacgt	gttcccccca	420
gagggtggccg	tgttcgagcc	tagcgaggcc	gagatcagcc	acacccagaa	agccaccctc	480
gtgtgcctgg	ccaccggctt	ttaccccgac	cacgtggac	tgtcttgg	gttcaacggc	540
aaagaggtgc	acagcggcgt	ctgcaccgac	ccccagcccc	tgaaagagca	gcccgccctg	600
aacgacagcc	gttactgtct	gagcagcaga	ctgagagtgt	cggccacctt	ctggcagaac	660
ccccggaaacc	acttcagatg	ccaggtgcag	ttctacggcc	tgagcgagaa	cgacgagtgg	720
acccaggacc	ggccaaagcc	cgtgaccagg	atcgtgtctg	ctgaggcctg	ggcagagcc	780
gattgcggct	tcaccagcga	gagcttaccag	cagggcgtgc	tgagcgc当地	catcctgtac	840
gagatcctgc	tggcaaggc	caccctgtac	gccgtgtgg	tgtccgc当地	gttgcgtatg	900
gccccatggtca	agcggaaagga	cagccggggc	tga			933

15 &lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 1809

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo C4beta-P2A-C4alfa - modificación con Cys, con codones optimizados

&lt;400&gt; 96

atgagcaacc	aggtgctgtg	ctgcgtggtg	ctgtgtttcc	tgggcgccaa	caccgtggac	60
ggcggcatca	cccagagccc	caagtacctg	ttccggaaag	agggccagaa	cgtcaccctg	120
agctgcgagc	agaacctgaa	ccacgacgcc	atgtactgtt	acagacagga	ccccggacag	180
ggcctgcggc	tgatctacta	cagccagatc	gtgaacgact	tccagaaggg	agatatcgcc	240
gagggtctaca	gcgtgtccag	agagaagaaa	gagtccctcc	cactgaccgt	gaccagcgcc	300
cagaagaacc	ccaccgcctt	ctacctgtgc	gccagctctc	ctggcgcctt	gtacgagcag	360
taccccgccc	ctggcaccctg	gctgacagt	accgaggacc	tgaagaacgt	gttccccc	420
gagggtggccg	tgttcgagcc	tagcgaggcc	gagatcagcc	acacccagaa	agccaccctc	480
gtgtgcctgg	ccaccggctt	ttaccccgac	cacgtggAAC	tgtcttggg	ggtaacggc	540
aaagaggtgc	acagcggcgt	ctgcaccgac	ccccagcccc	tgaaagagca	gcccgccctg	600
aacgacagcc	gttactgtct	gagcagcaga	ctgagagt	ccgcccac	ctggcagaac	660
ccccggaaacc	acttcagatg	ccaggtgcag	ttctacggcc	tgagcgagaa	cgacgagtgg	720
acccaggacc	gggccaagcc	cgtgaccctg	atcgtgtctg	ctgaggcctg	ggcagagcc	780
gattgcggct	tcaccagcga	gagctaccag	cagggcgtgc	tgagcgcac	catcctgtac	840
gagatcctgc	tgggcaaggc	caccctgtac	gccgtgtgg	tgtccccc	gtgtgtatg	900
gccatggtca	agcggaaagga	cagccggggc	ggttccggag	ccacgaactt	ctctctgtta	960
aagcaagcag	gagacgtgga	agaaaacccc	ggtccatga	ccagcatccg	ggccgtgttc	1020
atcttcctgt	ggctgcagct	ggacctcg	aacggcgaga	acgtggaaaca	gcaccccgac	1080
accctgagcg	tgcaggaagg	cgacagcgcc	gtcatcaagt	gcacccatcg	cgactccgccc	1140
agcaactact	tccctggta	caagcaggaa	ctggcaagc	ggcccccagct	gatcatcgac	1200
atccggtcca	acgtgggcga	gaagaaggac	cagcggatcg	ccgtgaccct	gaacaagacc	1260
gccaagcact	tcagcctgca	catcaccgag	acacagcccc	aggactccgc	cgtgtacttc	1320
tgtgccgcca	ccgaggacta	ccagctgatc	tggggagccg	gcaccaagct	gatcattaag	1380
cccgacatcc	agaaccccg	ccctggcg	taccagctgc	gggacagcaa	gagcagcgac	1440
aagagcgtgt	gcctgttac	cgacttcgac	agccagacca	acgtgtccc	gagcaaggac	1500
agcgacgtgt	acatcaccga	taagtgcgt	ctggacatgc	ggagcatgga	cttcaagagc	1560
aacagcgccg	tggcctggc	caacaagagc	gacttcgcct	gcgcacacgc	cttcaacaac	1620
agcattatcc	ccgaggacac	attctccca	agccccgaga	gcagctgcga	cgtgaagctg	1680
gtggaaaaga	gcttcgagac	agacaccaac	ctgaacttcc	agaacccatc	cgtgatcg	1740
ttccggatcc	tgctgctgaa	ggtggccggc	ttcaacctgc	tgatgaccct	gcccgtgtgg	1800
	tccagctga					1809

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 1809

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo C4beta-P2A-C4alfa-DLT - modificación con Cys, con codones optimizados

10

&lt;400&gt; 97

	atgagcaacc	aggtgtgtg	ctgcgtggtg	ctgtgtttcc	tgggcgc当地	caccgtggac	60	
	ggcggcatca	cccagagccc	caagtacctg	ttccggaaag	agggccagaa	cgtcaccctg	120	
	agctgcgagc	agaacctgaa	ccacgacgcc	atgtactgtt	acagacagga	cccccggacag	180	
	ggcctgcggc	tgatctacta	cagccagatc	gtgaacgact	tccagaaggg	agatatcgcc	240	
	gagggctaca	gcgtgtccag	agagaagaaa	gagtccctcc	cactgaccgt	gaccagcgcc	300	
	cagaagaacc	ccaccgcctt	ctacctgtgc	gccagctc	ctggcgc当地	gtacgagcag	360	
	tacccggcc	ctggcaccctg	gctgacagt	accgaggacc	tgaagaacgt	gttcccccca	420	
	gagggtggccg	tgttcgagcc	tagcgaggcc	gagatcagcc	acacccagaa	agccaccctc	480	
	gtgtgcctgg	ccaccggctt	ttaccccgac	cacgtggaa	tgtcttggg	ggtcaacggc	540	
	aaagaggtgc	acagcggcgt	ctgcaccgac	ccccagcccc	tgaaagagca	gcccgccctg	600	
	aacgacagcc	gttactgtct	gagcagcaga	ctgagagt	ccgcccac	ctggcagaac	660	
	ccccggaaacc	acttcagatg	ccaggtgcag	ttctacggcc	tgagcgagaa	cgacgagtgg	720	
	acccaggacc	gggccaagcc	cgtgaccctg	atcgtgtctg	ctgaggcctg	ggcagagcc	780	
	gattgcggct	tcaccagcga	gagctaccag	cagggcgtgc	tgagcgc当地	catcctgtac	840	
	gagatcctgc	tggcaaggc	caccctgtac	gccgtgtgg	tgtccgc当地	ggtgctgatg	900	
	gccatggta	agcggaaagga	cagccggggc	ggttccggag	ccacgaactt	ctctctgtta	960	
	aagcaagca	gagacgtgga	agaaaacccc	ggtcccatga	ccagcatccg	ggccgtgttc	1020	
	atcttcctgt	ggctgcagct	ggacctcg	aacggcgaga	acgtggaa	aca	gcaccccgac	1080
	accctgagcg	tgca	ggagg	cgacagcgcc	gtcatca	act	gcaccccgcc	1140
	agcaactact	tccctgtt	caagcaggaa	ctggcaagc	ggcccccagct	gatcatcgac	1200	
	atccggtcca	acgtggcga	gaagaaggac	cagcggatcg	ccgtgaccct	gaacaagacc	1260	
	gccaagca	tcagcctgca	catcaccgag	acacagcccc	aggactccgc	cgttacttc	1320	
	tgtgccgcca	ccgaggatct	gacgctgatc	tggggagccg	gcaccaagct	gatcattaag	1380	
	cccgacatcc	agaaccccga	ccctgcccgt	taccagctgc	gggacagcaa	gagcagcgac	1440	
	aagagcgtgt	gcctgttca	cgacttcgac	agccagacca	acgtgtccc	gagcaaggac	1500	
	agcgacgtgt	acatcaccga	taagtgcgtg	ctggacatgc	ggagcatgga	cttcaagagc	1560	
	aacagcggcc	tggcctggc	caacaagagc	gacttcgcct	gcgccaacgc	cttcaacaac	1620	
	agcattatcc	ccgaggacac	attcttccca	agccccgaga	gcagctgcga	cgtgaagctg	1680	
	gtggaaaaga	gcttcgagac	agacaccaac	ctgaacttcc	agaacctcag	cgtgatcg	1740	
	ttccggatcc	tgctgctgaa	ggtggccggc	ttcaacctgc	tgatgaccct	gcccgtgtgg	1800	
	tccagctga						1809	
	<210> 98							
	<211> 66							
5	<212> ADN							
	<213> Secuencia artificial							
	<220>							
	<223> péptido 2A de teschovirus porcino 1 (P2A)							
10	<220>							
	<400> 98							
	ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggaaaacccc	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	
25	ggtccc						66	
	<210> 100							
	<211> 63							
	<212> ADN							
30	<213> Secuencia artificial							

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

5 <400> 100  
 ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60  
 cct 63

10 <210> 101  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> péptido 2A de virus A de rinitis equina (VARE) 2A (E2A) péptido  
 <400> 101

20 ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60  
 cctggacct 69

25 <210> 102  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> péptido 2A de virus de enfermedad de pie y boca (F2A)  
 <400> 102

35 ggaagcggag tgaaaacagac tttgaatttt gaccctctca agttggcgaa agacgtggag 60  
 tccaaaccctg gacct 75

40 <210> 103  
 <211> 411  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> dominio variable de cadena P1alfa  
 <400> 103

50 atgctgactg ccagcctgtt gagggcagtc atagcctcca tctgtttgt atccagcatg 60  
 gctcagaagg taactcaagc gcagactgaa atttctgtgg tggagaagga ggatgtgacc 120  
 ttggactgtg tggatgaaac ccgtgataact acttattact tattctggta caagcaacca 180  
 ccaagtggag aattggttt ctttattcgt cgaaactctt ttgatgagca aaatgaaata 240  
 agtggtcggt attcttgaa cttccagaaa tccaccagtt ccttcaactt caccatcaca 300  
 gcctcacaag tcgtggactc agcagtatac ttctgtgctc tgagtggagc gcataaggat 360  
 agcaactatc agttaatctg gggcgctggg accaagctaa ttataaagcc a 411

55 <210> 104  
 <211> 426  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> dominio variable de cadena P15alfa  
 <400> 104

atggacaaga tcttaggagc atcattttta gttctgtggc ttcaactatg ctgggtgagt 60

ggccaacaga	aggagaaaag	tgaccagcac	caggtgaaac	aaagtccctca	atctttgata	120
gtccagaaag	gagggatttc	aattataaaac	tgtgctttag	agaacactgc	gtttgactac	180
tttccatgg	accaacaatt	ccctggaaa	ggccctgcat	tattgatagc	catacgtcca	240
gatgtgagtg	aaaagaaaaga	aggaagattc	acaatctcct	tcaataaaaag	tgccaagcag	300
ttctcattgc	atatcatgga	ttcccagcct	ggagactcag	ccacctactt	ctgtgcagca	360
agcccccagg	gggctggag	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	gaaggtggc	acagcttcac	tgtggctagg	acctggcatt	60
gcccagaaga	taactcaaac	ccaaccagga	atgtcgtgc	aggaaaagga	ggctgtgact	120
ctggactgca	catatgacac	cagtgatcaa	agttatggc	tattctggta	caagcagccc	180
agcagtgggg	aatgatttt	tcttatttt	caggggtctt	atgacgagca	aaatgcaaca	240
gaaggtcgct	actcattgaa	tttccagaag	gcaagaaaat	ccgccaacct	tgtcatctcc	300
gcttcacaac	tggggactc	agcaatgtat	ttctgtgcaa	tcccgactct	catggatagc	360
aactatcagt	taatctgggg	cgctgggacc	aagctaatta	taaagccca		408
15	<210> 106					
<211> 393						
<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial					
20	<220>					
<223> dominio variable de cadena P20alfa						
	<400> 106					
atgatgaaat	ccttgagagt	tttacttagt	atcctgtggc	ttcagttgag	ctgggtttgg	60
agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggaccctca	gtgttccaga	ggagccatt	120
gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	gttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatggtga	caaagaagat	240
ggaaggttt	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
tcccagccca	gtgattcagc	cacctaccc	tgtgccgtt	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	tttacttagt	atcctgtggc	ttcagttgag	ctgggtttgg	60
agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggaccctca	gtgttccaga	ggagccatt	120
gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	gttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatggtga	caaagaagat	240
ggaaggttt	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
tcccagccca	gtgattcagc	cacctaccc	tgtgccgcaa	ataatgcagg	caacatgctc	360
	acctttggag	ggggaaacaag	gttaatggtc	aaaccc		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	caaacaaaatg	tgtcacaaag	taaggattct	120
gatgtgtata	tcacagacaa	atgtgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	caagagcaac	180
agtgctgtgg	cctggagcaa	caaatctgac	tttgcattgt	caaacgcctt	caacaacagc	240
attattccag	aagacacaccc	cttccccagc	ccagaaaagtt	cctgtatgt	caagctggtc	300
gagaaaaagct	ttgaaacaga	tacgaaccta	aactttcaaa	acctgtcagt	gattgggttc	360
cgaatcctcc	tcctgaaagt	ggccgggttt	aatctgctca	tgacgctgctg	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	caaacaaaatg	tgtcacaaag	taaggattct	120
gatgtgtata	tcacagacaa	atgtgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	caagagcaac	180
agtgctgtgg	cctggagcaa	caaatctgac	tttgcattgt	caaacgcctt	caacaacagc	240
attattccag	aagacacaccc	cttccccagc	ccagaaaagtt	cctgtatgt	caagctggtc	300
gagaaaaagct	ttgaaacaga	tacgaaccta	aactttcaaa	acctgtcagt	gattgggttc	360
cgaatcctcc	tcctgaaagt	ggccgggttt	aatctgctca	tgacgctgctg	gctgtggtcc	420
5 agc						423

25 <210> 110  
 <211> 423  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> dominio constante de cadena P22alfa - modificación con Cys  
 <400> 110

catatccaga	accctgaccc	tgccgtgtac	cagctgagag	actctaaatc	cagtgacaag	60
tctgtctgcc	tattcaccga	ttttgattct	caaacaaaatg	tgtcacaaag	taaggattct	120
gatgtgtata	tcacagacaa	atgtgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	caagagcaac	180
agtgctgtgg	cctggagcaa	caaatctgac	tttgcattgt	caaacgcctt	caacaacagc	240
attattccag	aagacacaccc	cttccccagc	ccagaaaagtt	cctgtatgt	caagctggtc	300
gagaaaaagct	ttgaaacaga	tacgaaccta	aactttcaaa	acctgtcagt	gattgggttc	360
cgaatcctcc	tcctgaaagt	ggccgggttt	aatctgctca	tgacgctgctg	gctgtggtcc	420
35 agc						423

35 <210> 111  
 <211> 402  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 111

```

atgggctgca ggctgctctg ctgtgcgggtt ctctgtctcc tgggagcggt ccccatggaa      60
acgggagtttta cgccagacacc aagacacccctg gtcatggaa tgacaaataa gaagtctttg      120
aaatgtgaac aacatctggg gcataacgct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag      180
ccactggagc tcatgtttgtt ctacaactttt aaagaacaga ctgaaaacaa cagtgtgcca      240
agtgcgttctt caccgtaaatg ccccaacacgc tctcactttt tccttcaccc acacaccctg      300
cagccagaag actcggccctt gtatctctgtt gcccagcagcc aagatgaaca gttcctctac      360
5      aatgagcagt tcttcgggccc agggacacgg ctcaccgtgc ta      402

```

<210> 112

<211> 399

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena P15beta

15 <400> 112

```

atgggcacca gcctcctctg ctggatggcc ctgtgtctcc tggggcaga tcacgcagat      60
actggagtcttccc cccaggaccc cagacacaag atcacaaaaga ggggacagaa tgtaacttcc      120
aggtgtgatc caatttctga acacaaccgc ctttattggt accgacagac cctggggcag      180
ggcccagagt ttctgactta cttccagaat gaagctcaac tagaaaaatc aaggctgctc      240
agtgtatcggt tctctgcaga gaggcctaag ggtatcttctt ccaccttggg gatccagcgc      300
acagagcagg gggactcggc catgtatctc tgcgtccagca gcttagctta cggaaagat      360
acgcagtatt ttggcccagg caccggctg acagtgctc      399

```

<210> 113

20 <211> 393

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> dominio variable de cadena P18beta

<400> 113

```

atgggctcctt ggaccctctg ctgtgtgtcc ctttgcattcc tggtagcaaa gcacacagat      60
gctggagtttta tccagtcacc ccggcacagag gtgacagaga tgggacaaga agtgactctg      120
agatgtaaac caatttcagg acatgactac ctttctggt acagacagac catgtatgcgg      180
ggactggagtttgcattta ctttaacaac aacgttccga tagatgattc agggatgccc      240
gaggatcgat tctcagctaa gatgcctaattt gcatcattctt ccactctgaa gatccagccc      300
tcagaaccca gggactcggc tgcgtacttc tgcgtccagca gtgtctcggtt ttcggaaagct      360
30      ttctttggac aaggcaccag actcacagttt gta      393

```

<210> 114

<211> 384

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> dominio variable de cadena P20beta

<400> 114

40

	atggaaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgttcc tggctgttagg cctcgttagat	60
	gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaaagga cgggagagaa agttttctg	120
	aatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg	180
	gggctacggc tgatctattt ctcatatgat gttaaaatga aaaaaaagg agatattcct	240
	gagggttaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgccc	300
	agcacaacc agacatctat gtacctctgt gccaccagtc atcagccccca gcattttgggt	360
	gatgggactc gactctccat ccta	384
	<210> 115	
	<211> 387	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> dominio variable de cadena P22beta	
10	<400> 115	
	atggaaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgttcc tggctgttagg cctcgttagat	60
	gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaaagga cgggagagaa agttttctg	120
	aatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg	180
	gggctacggc tgatctattt ctcatatgat gttaaaatga aaaaaaagg agatattcct	240
	gagggttaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgccc	300
	agcacaacc agacatctat gtacctctgt gccagcagtt ctataaatga gcagttcttc	360
	gggcccaggga 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 acaagggttt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag	60
	atctcccaca cccaaaaggc cacactgtgt tgctctggcca caggcttctt ccccgaccac	120
	gtggagctga gctgggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggctcg cacggacccg	180
	cagccccctca aggagcagcc cgcctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg	240
	agggtctcgg ccacccctcg gcagaaccccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc	300
	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc cagatagggg ccaaaccgt caccagatc	360
	gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tggcttttgc ctcgggtgc ctaccagcaa	420
	ggggtcctgt ctgccaccat cctctatgag atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct	480
25	gtgtctggta ggcacccctgt gttgtatggcc atggtaaga 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	tctgtttgt atccagcatg	60
gctcagaagg taactcaagc	gcagactgaa atttctgtgg	tggagaagga ggtatgtgacc	120
ttggactgtg tgtatgaaac	ccgtgatact acttattact	tattctggta caagcaacca	180
ccaaagtggag aattgggttt	ccttattctgt cggaactctt	ttgatgagca aaatgaaata	240
agtggtcggt attcttgaa	cttccagaaa tccaccagtt	ccttcaactt caccatcaca	300
gcctcacaag tcgtggactc	agcagtatac ttctgtgtc	tgagtgaggc gcatagggat	360
agcaactatc agttaatctg	gggcgctggg accaagctaa	ttataaagcc agatatccag	420
aaccctgacc ctgccgtgt	ccagctgaga gactctaaat	ccagtgacaa gtctgtctgc	480
ctattcaccg attttGattc	tcaaacaat gtgtcacaaa	gtaaggattc tgatgtgtat	540
atcacagaca aatgtgtgct	agacatgagg tctatggact	tcaagagcaa cagtgtgtg	600
gcctggagca acaaatctga	cttgcatgt gcaaaccgcct	tcaacaacag cattattcca	660
gaagacaccc tcttccccag	cccagaaaagt tcctgtgatg	tcaagctggt cgagaaaagc	720
tttggaaacag atacgaacct	aaacttcaa aaccgtcag	tgattgggtt cccaatccctc	780
ctccctgaaag tggccgggtt	taatctgtc atgacgctgc	ggctgtggtc cagcggttcc	840
ggagccacga acttctctct	gtttaagacaa gcaggagacg	tggaagaaaa ccccggtccc	900
atgggctgca ggctgctctg	ctgtgcgggt ctctgtctcc	tggagcggt ccccatggaa	960
acgggagttt cgcagacacc	aagacacccgt gtcattggaa	tgacaataa gaagtctttg	1020
aaatgtgaac aacatctggg	gcataacgct atgtattgtt	acaagcaaag tgtaagaag	1080
ccactggagc tcatgtttgt	ctacaacttt aaagaacaga	ctgaaaacaa cagtgtgcca	1140
agtgccttct cacctgaatg	ccccaaacagc tctcacttat	tccttcaccc acacaccctg	1200
cagccagaag actcggccct	gtatctctgt gccagcagcc	aagatgaaca gttcctctac	1260
aatgagcagt tcttcgggca	agggacacgg ctcaccgtgc	tagaggacct gaaaaacgtg	1320
ttcccacccg aggtcgctgt	gtttgagcca tcagaagcag	agatctccca caccaaaaag	1380
gccacactgg tgcgcctggc	cacaggcttc taccggacc	acgtggagct gagctgggtg	1440
gtgaatggga aggaggtgca	cagtgggtc tgcacagacc	cgcagccct caaggagcag	1500
cccgccctca atgactccag	atactgcctg agcagccgc	tgagggtctc gcccaccc	1560
tggcagaacc cccgcaacca	cttccgctgt caagtccagt	tctacggct ctggagaat	1620
gacgagtggaa cccaggatag	ggccaaacact gtcacccaga	tcgtcagcgc cgaggcctgg	1680
ggttagagcag actgtggctt	cacctccgag tcttaccagc	aaggggctt gtctgccacc	1740
atccctctatg agatcttgct	aggaaaggcc accttgtatg	ccgtgctggt cagtccctc	1800
gtgctgatgg ccatggtaa	gagaaaggat tccagaggct	ag	1842

&lt;210&gt; 118

5 &lt;211&gt; 1842

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; constructo P1alfa-P2A-P1beta - modificación con Cys, con codones optimizados

&lt;400&gt; 118

atgctgacag cctctctgct gagagccgtg atcgccagca tctgcgtgg gtc	60
gcccagaaag tgaccgcgc ccagaccgag atcagcgtgg tggaaaaaga agatgtgacc	120
ctggactgcg tgcgtggac acgggacacc acctactacc tggatccgg cggaaacagct tcgacgagca gaacgagatc	180
cccgccggcg agctgggttt cctgatccgg cggaaacagct tcgacgagca gaacgagatc	240
tccggccggt acagctggaa cttccagaag tccaccagca gcttcaactt caccatcacc	300
gccagccagg tggatggacag cgccgtgtac ttctgcgcgg tgagcggagc ccaccgggac	360
agcaactacc agctgatctg gggagccggc accaagctga tcaatcaagcc cgacatccag	420
aaccccgacc cccgcgtgtt ccagctgaga gacagcaaga gcagcgacaa gaggcgtgtc	480
ctgttcaccc acttcgacag ccagaccaac gtgtcccaaga gcaaggactc cgacgtgtac	540
atcaccgata agtgcgtgct ggacatgcgg agcatggact tcaagagcaa ctccgcccgt	600
gcctggtcca acaagagcga ctgcgcgtc gccaacgcct tcaacaacag cattatccc	660
gaggacacat tcttcccaag ccccgagagc agctgcgacg tgaagctgg gggaaagagc	720
ttcgagacag acaccaaccc gaatttccag aacctgagcg tgatcgctt cccgatccgt	780
ctgctgaagg tggccggcgtt caacctgtc atgaccgtc ggctgtggc ctcagggttcc	840
ggagccacga acttctctt gttaaagcaa gcaggagacg tggaaagaaaa ccccggtccc	900
atgggctgcc ggctgctgtt ttgcgcgtt ctgtgtctgc tgggcgcgtt gcctatggaa	960
accggcgtga cccagacccc cagacacccgt gtcacatggca tgaccaacaa gaaaagcctg	1020
aagtgcgagc agcacccctt ccacaacgcg atgtactggt ataagcagag cgccaaagaaa	1080
cccctggAAC tgcgttgcgt gtacaacttc aaagagcaga ccgagaacaa cagcgtgccc	1140
agccgggttca gccccggatgt ccccaatagc agccacccgt ttctgcgttgc gcacaccctg	1200
cagccggagg actccggccctt gtacccgtgtt gccagcagcc aggacgagca gttccgttac	1260
aatgagcagt tcttccggcc tggcaccctt ctgaccgtc tggaaagatct gaagaacgtt	1320
ttcccccccg aggtggccgtt gttcgagccctt agcaggccg agatctccca caccggaaaa	1380
gccaccctcg tgcgtccgtt caccggcttc taccggacc acgtggaaact gttccgttgg	1440
gtcaacggca aagagggttca cagcggcgcc tgcaccggacc cccagccctt gaaagagcag	1500
cccgccctga acgacagccg gtactgcctg agcagccgac tcagagtgtc cgccacccctt	1560
tggcagaacc cccggaaacca ctccagatgc caggtgcagt tctacggccctt gaggcggatc	1620
gacgagtgga cccaggaccg ggccaaaggctt gtgaccggcaga tcgtgtcagc cgaggccctgg	1680
ggcagagccg attgcggctt caccagcgag agtaccaccgc agggcgtgtt gaggcggacc	1740
atccctgtacg agatccgtctt gggcaaggcc accctgtacg ctgtgtgg gtcggccctg	1800
gtgtgtatgg ccatggtaa gcgaaaggac agccggggctt ga	1842

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 1854

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P15alfa-P2A-P15beta - modificación con Cys

10 &lt;400&gt; 119

atggacaaga tcttaggagc atcatttttta gttctgtggc ttcaactatg ctgggtgagt	60
ggccaaacaga aggaaaaag tgaccagcag caggtgaaac aaagtccca atctttgata	120
gtccagaaag gaggatttc aattataaac tgcgtttatg agaacactgc gtttactac	180

tttccatgg	accaacaatt	ccctggaaa	ggccctgc	tattgata	gcatacgtcca	240
gatgtgag	tgaaaaga	agaagattc	acaatctc	tcaataaaag	tgccaa	300
tttcattgc	atatcatg	gaatcccag	ctggagactc	gacccctactt	ctgtgc	360
agcccccagg	gggctggag	ttaccaactc	actttcgg	aggggacca	actctcggtc	420
ataccaaata	tccagaaccc	tgaccctg	gtgtaccag	tgagagactc	taaatcc	480
gacaagtctg	tctgc	caccgattt	gattctcaaa	caa	atgtgtc	540
gattctgat	tgat	atcacagaaatgt	gtgctagaca	tgagg	gttatc	600
agcaacagt	ctgtggc	cctg	gagcaacaaa	tctgacttt	catgtgc	660
aacagcatta	ttcc	cagaaga	caccttctc	cccagccc	aaagttc	720
ctgg	tcgaga	aaagctt	ga	aacagata	ttcaaaac	780
gggttccg	aa	tcctc	cct	gaaagtgg	ctg	840
tggtcc	ccag	cg	gttccgg	gagc	actg	900
gaaaaccc	cc	gtcc	catg	gccc	tgat	960
gcagatc	ac	cg	agata	ctt	gtca	1020
cagaatgt	aa	ctt	cagg	gac	gtc	1080
cagacc	ctt	gg	gcagg	gac	actg	1140
aaatca	aggc	tg	ctc	actg	taact	1200
ttgg	gagat	cc	agc	gcac	atct	1260
gcttac	ggg	aa	gata	acg	ctgt	1320
ctgaaa	aaac	gtt	ccc	cg	gtt	1380
cacac	ccaa	cc	gg	gtc	gagg	1440
ctgag	ctgg	gg	gt	gg	gtt	1500
ctcaagg	ag	gg	gg	gg	cc	1560
tcgg	ccac	cc	gg	gg	cc	1620
ctct	cg	cc	gg	gg	ac	1680
gccgagg	cc	gg	gg	gg	gt	1740
ctgtct	gcca	cc	gg	gg	gt	1800
gtcagt	gccc	cc	gg	gg	gt	1854

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 1854

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P15alfa-P2A-P15beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10 &lt;400&gt; 120

atggacaaga	tcctggcg	cagttcctg	gtgctgtgg	tgcagctgtg	ctgggtgtcc	60
ggccagcaga	aagagaagtc	cgaccagcag	caggtaaac	agagccccca	gagcctgatc	120
gtgcagaagg	gcggcatcg	catcatcaac	tgccctacg	agaataccgc	cttcgactac	180
ttccccctgg	atcagcagtt	ccccggcaag	ggacctgccc	tgctgatcgc	catcagaccc	240
gacgtgtccg	agaagaaaga	gggcccggtc	accatcagct	tcaacaagag	cgccaagcag	300
ttcagcctgc	acatcatgga	cagccagccc	ggcgcacagcg	ccacctactt	ttgtgccgccc	360
agccctcagg	gchgctggcag	ctaccaccc	acccctggca	agggcaccaa	gctgagcgtg	420
atcccccaaca	tccagaaccc	cgaccggc	gtgtaccagc	tgccggacag	caagagcagc	480
gacaagagcg	tgtccctgtt	caccgactc	gacagccaga	ccaacgtgc	ccagagcaag	540
gacagcgcacg	tgtacatcac	cgataagtgc	tgctggaca	tgccggacat	ggacttcaag	600
agcaacagcg	ccgtggcctg	gtccaacaag	tccgacttcg	cctgcggccaa	cgcccttcaac	660
aacagcatca	tccccgagga	cacattctc	ccaagccccg	agagcagctg	cgacgtgaag	720
ctggtgaaaa	agagcttcga	gacagacacc	aacctgaact	tccagaacct	gtccgtgatc	780
ggcttccgga	tcctgctgct	gaaggtggcc	ggcttcaacc	tgctgatgac	cctgcggctg	840
tggtccagcg	gttccggagc	cacgaacttc	tctctgttaa	agcaagcagg	agacgtggaa	900
aaaaaccccg	gtcccattgg	caccagcctg	ctgtgctgga	tggccctgtg	cctgctgggc	960
gccgatcacc	ctgataccgg	cgtgtcccag	gaccccccggc	acaagatcac	caagcggggc	1020
cagaacgtga	ccttcagatg	cgaccatc	agcgagcaca	accggctgt	ctgg tacaga	1080
cagaccctcg	gccaggggacc	cgagttcctg	acctacttcc	agaatgaggc	ccagctggaa	1140
aagtcccgcc	tgctgagcga	ccgggttcagc	gccgaacggc	ccaagggcag	cttcagcacc	1200
ctggaaatcc	agcggaccga	gcagggagac	tccgccatgt	acctgtgtgc	cagcagcctg	1260
gcctacggca	aggacacaca	gtacttcggc	cctggcaccc	ggctgaccgt	gctggaagat	1320
ctgaagaacg	tgttccccc	agaggtggcc	gtgttcgagc	ccagcgaggc	cgagatctct	1380
cacaccagg	aagccaccct	ggtctgcctg	gccaccggct	tctaccggc	ccacgtggaa	1440
ctgtcttgg	gggtcaacgg	caaagaggc	cacagcggcg	tctgcaccga	cccccagccc	1500
ctgaaagagc	agcccccct	gaacgactct	cggtaactgc	tgagcagccg	gctgagagtg	1560
tecccccac	tctggcagaa	ccccccggac	cacttcagat	gccaggtgca	gttctacggc	1620
ctgagcgaga	acgacgagtg	gacccaggac	cgggccaagc	ccgtgaccca	gattgtgtct	1680
gccgaggcc	ggggcagagc	cgattgcggc	ttcaccagcg	agagctacca	gcagggcgtg	1740
ctgagcgcca	ccatccctgt	cgagatcctg	ctgggcaagg	ccaccctgt	cgccgtgctg	1800
gtgtccgctc	tggtgctgat	ggccatggc	aaacggaaagg	acagccgggg	ctga	1854

&lt;210&gt; 121

5 &lt;211&gt; 1824

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; constructo P18alpha-P2A-P18beta - modificación con Cys

&lt;400&gt; 121

atgtcacttt	ctagcctgct	gaaggtggc	acagcttcac	tgtggctagg	acctggcatt	60		
gcccagaaga	taactcaaac	ccaaccagga	atgttcgtgc	aggaaaagga	ggctgtgact	120		
ctggactgca	catatgacac	cagtgatcaa	agttatggc	tattctggta	caagcagccc	180		
agcagtgggg	aatatgatttt	tcttatttt	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		
ttcaccgatt	ttgattctca	aacaaatgtg	tcacaaagta	aggattctga	tgtgtatatc	540		
acagacaaat	gtgtgctaga	catgaggtct	atggacttca	agagcaacag	tgctgtggcc	600		
tggagcaaca	aatctgactt	tgcatgtc	aacgccttc	acaacagcat	tattccagaa	660		
gacacccct	tccccagccc	agaaaagttcc	tgtgatgtca	agctggtcga	gaaaagctt	720		
gaaacagata	cgaacctaaa	cttcaaaac	ctgtcagtga	ttgggttcccg	aatcctccctc	780		
ctgaaagtgg	ccgggtttaa	tctgctcatg	acgctgcggc	tgtggtccag	cggttccgga	840		
gccacgaact	tctctctgtt	aaagcaagca	ggagacgtgg	aagaaaaccc	cggtcccatg	900		
ggctcctgga	ccctctgctg	tgtgtccctt	tgcatcctgg	tagcaaagca	cacagatgct	960		
ggagttatcc	agtcaaaaa	gcacgagggt	acagagatgg	gacaagaagt	gactctgaga	1020		
tgtaaacc	tttcaggaca	tgactac	ttctggtaca	gacagaccat	gatgcgggga	1080		
ctggagttgc	tcatttactt	taacaacaac	gttccgatag	atgattcagg	gatgcccag	1140		
gatcgattct	cagctaagat	gccta	atgc	tcattctcca	ctctgaagat	ccagccctca	1200	
gaacccagg	actcagctgt	gtacttctgt	gccagcagt	tctcgggttc	ggaagctt	1260		
tttggacaag	gcaccagact	cacagttga	gaggac	ataagggtt	cccacccgag	1320		
gtcgctgtgt	ttgagccatc	agaagcagag	atctcccaca	cccaaaaggc	cacactgg	1380		
tgccctggcca	caggcttctt	ccccgaccac	gtggagctga	gctgggtgggt	gaatgggaag	1440		
gaggtgcaca	gtggggctcg	cacggaccc	cagccc	ctca	aggagcagcc	cgccctcaat	1500	
gactccagat	actgcctgag	cagccgc	ctg	agggtctcg	ccacccct	gcagaacccc	1560	
cgcaccaact	tccgctgtca	agtccagttc	tacggg	ct	cgagaatga	cgagtggacc	1620	
caggataggg	ccaaacccgt	cacccagatc	gtcagc	ggc	aggcctgggg	tagagcagac	1680	
tgtggcttta	cctcggtgtc	ctaccagcaa	gggtc	c	gtgccaccat	cctctatgag	1740	
atctgcttag	ggaaggccac	cctgtatgct	gtgt	gtc	gcgc	ccctgtgt	gttgatggcc	1800
atggtcaaga	gaaaggattt	ctga					1824	

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 1824

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P18alfa-P2A-P18beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10 &lt;400&gt; 122

atgagcctga	gcagcctgct	gaaggtggtg	accgcctctc	tgtggctggg	ccctggcatt	60
gcccagaaga	tcacccagac	ccagccggc	atgttcgtgc	aggaaaaaga	agccgtcacc	120
ctggactgca	cctacgacac	cagcgtatcg	agctacggcc	tgttctggta	caagcagccc	180
agcagcggcg	agatgatctt	cctgatctac	cagggcagct	acgacgagca	gaacgcacc	240

gaggggccgg	acagcctgaa	cttccagaag	gcccggaa	gtgatcagc	300
gccagccagc	tggcgacag	cgccatgtac	tttgcgcca	tcccccac	360
aactaccagc	tgatctgggg	agccggcacc	aagctgatca	tcaagcccga	420
cccgaccccg	ccgtgtacca	gctgagagac	agcaagagca	gcgacaagag	480
ttcacccact	tcgacagcca	gaccaacgtg	tcccagagca	aggactccga	540
accgataagt	gcgtgctgga	catgcggagc	atggacttca	agagcaactc	600
tggtccaaca	agagcgactt	cgccctgcg	aacgccttca	acaacagcat	660
gacacattct	tcccaagccc	cgagagcagc	tgcgacgtga	agctgggaa	720
gagacagaca	ccaacctgaa	tttccagaac	ctgagcgtga	tcggcttccg	780
ctgaaggtgg	ccggcttcaa	cctgctgatg	accctgcggc	tgtggtcc	840
gccacgaact	tctctctgtt	aaagcaagca	ggagacgtgg	aagaaaaccc	900
ggcagctgga	ccctgtgctg	cgtgagcctg	tgcatcctgg	tggccaagca	960
ggcgtcatcc	agagccccag	gcacgagg	accgagatgg	gccagga	1020
tgcaagccca	tcagcggcca	cgactac	ttctggtaca	ggcagaccat	1080
ctggactgc	tgatctactt	caacaaca	gtgcccac	acgacagcgg	1140
gaccggttca	gcgccaagat	gcccaac	agttcagca	ccctgaagat	1200
gagccccggg	actctgcccgt	gtatttctgt	gcctcctccg	tgtccggcag	1260
tttggcagg	gcaccagact	gacagtgg	gaggacctga	acaagggtt	1320
gtggccgtgt	ttgagcccag	cgaggccag	atcagccaca	cccagaa	1380
tgccctggcca	ccggctttt	ccccgaccac	gtggagctgt	cttgggggt	1440
gaggtgcaca	gcggcgtctg	caccgac	cagcccctga	aagagcagcc	1500
gacagccgg	actgcctgag	cagcagactg	cgggtgtccg	ccacccctgt	1560
cggaaaccact	tccggtgcca	ggtgcagttc	tacggcctga	gcaacgac	1620
caggatagag	ccaaggctgt	gacccagatc	gtgtctgc	aaggctgggg	1680
tgccggcttca	ccagcgtgtc	ctaccagcag	gggtgtctgt	cagagccgac	1740
atccctgctgg	gcaaggccac	actgtacg	gtgtctgg	ccgttacgag	1800
atggtgaagc	ggaaggactt	ctga			1824

&lt;210&gt; 123

&lt;211&gt; 1800

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P20alfa-P2A-P20beta - modificación con Cys

10 &lt;400&gt; 123

atgatgaaat	ccttgagagt	tttactagtg	atcctgtggc	ttcagttgag	ctgggtttgg	60
agccaacaga	aggaggtgga	gcagaattct	ggaccctca	gtgttcaga	ggagccatt	120
gcctctctca	actgcactta	cagtgaccga	ggttcccagt	ccttcttctg	gtacagacaa	180
tattctggga	aaagccctga	gttgataatg	tccatatact	ccaatgtga	caaagaagat	240
ggaagggtta	cagcacagct	caataaagcc	agccagtatg	tttctctgct	catcagagac	300
tcccagccca	gtgattcagc	cacctaccc	tgtgccgtt	tagaaggcca	gaagctgctc	360
tttgcaggg	ggaccatgtt	aaaggtggat	cctaataatcc	agaaccctga	ccctgccgtg	420
taccagctga	gagactctaa	atccagtgac	aagtctgtct	gcctattcac	cgattttgat	480
tctcaaacaa	atgtgtcaca	aagtaaggat	tctgatgtgt	atatcacaga	caaatgtgtg	540
ctagacatga	ggtctatgga	cttcaagagc	aacagtgctg	tggcctggag	caacaaatct	600
gactttgcat	gtgcaaacgc	cttcaacaac	agcattattc	cagaagacac	cttcttcccc	660
agcccagaaa	gttcctgtga	tgtcaagctg	gtcgagaaaa	gctttgaaac	agatacgaac	720
ctaaactttc	aaaacctgtc	agtgattggg	ttccgaatcc	tcctcctgaa	atggccggg	780
ttaatctgc	tcatgacgct	gcggctgtgg	tccagcgggt	ccggagccac	gaacttctct	840
ctgttaaagc	aagcaggaga	cgtggaagaa	aaccccggtc	ccatggaaat	caggctcctg	900
tgtcgtgtgg	cctttgttt	cctggctgtta	ggcctcgtag	atgtgaaagt	aacccagagc	960
tcgagatatc	tagtcaaag	gacgggagag	aaagttttc	tggaatgtgt	ccaggatatg	1020
gaccatgaaa	atatgttctg	gtatcgacaa	gaccagggtc	tggggctacg	gctgatctat	1080
ttctcatatg	atgttaaaat	gaaagaaaaaa	ggagatattc	ctgaggggta	cagtgtctct	1140
agagagaaga	aggagcgctt	ctccctgatt	ctggagtccg	ccagcaccaa	ccagacatct	1200
atgtacctct	gtgccaccag	tcatcagccc	cagcattttg	gtgatggac	tcgactctcc	1260
atcctagagg	acctgaacaa	ggtgttccca	cccgaggctg	ctgtgttga	gccatcagaa	1320
gcagagatct	cccacaccca	aaaggccaca	ctgggtgtcc	tggccacagg	cttcttcccc	1380
gaccacgtgg	agctgagctg	gtgggtgaat	gggaaggagg	tgcacagtgg	gtctgcacg	1440
gacccgcagc	ccctcaagga	gcagcccgcc	ctcaatgact	ccagatactg	cctgagcagc	1500
cgcctgaggg	tctcgccac	cttctggcag	aaccccccgc	accactccg	ctgtcaagt	1560
cagttctacg	ggctctcgga	gaatgacgag	tggaccagg	atagggccaa	acccgtcacc	1620
cagatcgtca	gcccgcaggc	ctggggtaga	gcagactgtg	gcttacctc	gtgtcctac	1680
cagcaagggg	tcctgtctgc	caccatcc	tatgagatcc	tgcttaggaa	ggccacccctg	1740
tatgctgtgc	tggtcagcgc	ccttgttttgc	atggccatgg	tcaagagaaa	ggatttctga	1800

5 <210> 124  
 <211> 1800  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> constructo P20alfa-P2A-P20beta - modificación con Cys, con codones optimizados  
 <400> 124

atgatgaagt	ccctgcgggt	gctgctggc	atcctgtggc	tgca	ctgggtctgg	60
tcc	c	caga	a	ag	gtgg	120
gc	ag	c	ac	ac	ct	180
cc	ag	c	tc	at	at	240
cc	gg	ct	ct	ct	ct	300
cc	gg	tt	cc	cc	gg	360
cc	gg	tt	cc	gg	gg	420
cc	gg	tt	cc	gg	gg	480
cc	gg	tt	cc	gg	gg	540
cc	gg	tt	cc	gg	gg	600
cc	gg	tt	cc	gg	gg	660
cc	gg	tt	cc	gg	gg	720
cc	gg	tt	cc	gg	gg	780
cc	gg	tt	cc	gg	gg	840
cc	gg	tt	cc	gg	gg	900
cc	gg	tt	cc	gg	gg	960
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1020
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1080
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1140
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1200
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1260
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1320
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1380
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1440
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1500
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1560
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1620
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1680
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1740
cc	gg	tt	cc	gg	gg	1800

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 1812

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P22alfa-P2A-P22beta - modificación con Cys

10 &lt;400&gt; 125

atgat	aat	cctt	gag	gt	ttt	60
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	120
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	180
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	240
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	300
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	360
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	420
at	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	480

gattctcaaa	caaatgtgtc	acaaagtaag	gattctgatg	tgtatatcac	agacaaaatgt	540
gtgctagaca	tgaggtctat	ggacttcaag	agcaacagtg	ctgtggctg	gagcaacaaa	600
tctgactttg	catgtgcaaa	cgccttcaac	aacagcatta	ttccagaaga	caccttcttc	660
cccagcccgag	aaagttcctg	tgatgtcaag	ctggtcgaga	aaagcttga	aacagatacg	720
aacctaaact	ttcaaaaacct	gtcagtgtt	gggttccgaa	tcctccct	gaaagtggcc	780
gggttaatc	tgctcatgac	gctgcggctg	tggtccagcg	gttccggagc	cacgaacttc	840
tctctgttaa	agcaagcagg	agacgtggaa	gaaaaccccg	gtcccattggg	aatcaggctc	900
ctgtgtcggt	tggcctttt	tttcctggct	gttaggcctcg	tagatgtgaa	agtaacccag	960
agctcgagat	atctagtcaa	aaggacggga	gagaaaagttt	ttcttggaaat	tgtccaggat	1020
atggaccatg	aaaatatgtt	ctggtatcga	caagaccccg	gtctgggct	acggctgatc	1080
tatttctcat	atgatgttaa	aatgaaaagaa	aaaggagata	ttccctgaggg	gtacagtgtc	1140
tctagagaga	agaaggagcg	cttctccctg	attctggagt	ccgcccac	caaccagaca	1200
tctatgtacc	tctgtgcccag	cagttctata	aatgagcagt	tcttcgggccc	aggacacgg	1260
ctcaccgtgc	tagaggacct	gaaaaacgtg	ttcccaccccg	aggtcgtgt	gtttgagcca	1320
tcagaaggcag	agatctccca	cacccaaaag	gccacactgg	tgtgcctggc	cacaggcttc	1380
taccccgacc	acgtggagct	gagctgggtgg	gtgaatggga	aggaggtgca	cagtggggtc	1440
tgcacagacc	cgcagccct	caaggagcag	ccgcacccctca	atgactccag	atactgcctg	1500
agcagccgccc	tgagggctc	ggccacccctc	tggcagaacc	ccgcacca	cttccgtgt	1560
caagtccagt	tctacgggct	ctcgagaaat	gacgagtgga	cccaggatag	ggccaaacct	1620
gtcaccggaga	tcgtcagcgc	cgaggcctgg	ggtagagcag	actgtggctt	cacccctcgag	1680
tcttaccaggc	aaggggctct	gtctgccacc	atcctctatg	agatcttgct	aggaaggcc	1740
accttgcgtatg	ccgtgctggt	cagtgcctc	gtgctgatgg	ccatggtaa	gagaaaggat	1800
tccagaggct	ag					1812

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 1812

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; constructo P22alfa-P2A-P22beta - modificación con Cys, con codones optimizados

10 &lt;400&gt; 126

atgatgaagt	ccctgcgggt	gctgctggc	atcctgtggc	tgcagctgag	ctgggtctgg	60
tcccgaga	aagaggtgga	acagaacacgc	ggccctctga	gcgtgcccga	aggcgctatc	120
gccagcctga	actgcaccta	cagcgaccgg	gtgtcccaga	gcttcttctg	gtacagacag	180
tacagcggca	agagccccga	gctgatcatg	agcatctaca	gcaacggcga	caaagaggac	240
ggccgggtca	ccgcccagct	gaacaaggcc	agccagtacg	tgtccctgct	gatccgggac	300
agccagccca	gcgacagcgc	cacatacctg	tgccgcgc	acaacggcg	caacatgctg	360
accttcggcg	gaggcaccgg	gctgatggc	aagcccccaca	tccagaaccc	cgaccccgcc	420
gtgttaccagc	tgccggatag	caagagcagc	gacaagagcg	tgtgcctgtt	caccgacttc	480
gacagccaga	ccaacgtgtc	ccagtccaag	gacagcgcacg	tgtacatcac	cgataagtgc	540
gtgctggaca	tgccggagcat	ggacttcaag	agcaacagcg	ccgtggctg	gtccaacaag	600
agcgacttcg	cctgcgc	ccaa	cgccttcaac	aacagcatta	tccccgagga	660
ccaagccccg	agagcagctg	cgacgtgaag	ctggtgaaa	agagcttcga	gacagacacc	720
aacctgaact	tccagaaccc	gagcgtgatc	ggcttccgg	tcctgctgct	gaaggtggcc	780
ggcttcaacc	tgctgatgac	cctgcggctg	tggtccagcg	gttccggagc	cacgaacttc	840
tctctgttaa	agcaagcagg	agacgtggaa	aaaaaccccg	gtcccatggg	catccggctg	900
ctgtgcagag	tggccttctg	cttcctggcc	gtgggcctgg	tggacgtgaa	agtgacccag	960
agcagcagat	acctggtcaa	gcccgcggc	gagaaggtgt	tcctggaatg	cgtgcaggat	1020
atggaccacg	agaacatgtt	ttggatcagg	caggatcctg	gactggact	gcggctgatc	1080
tacttctcct	acgacgtgaa	gatgaaggaa	aaggcgaca	tccccgaggg	ctacagcgtg	1140
tccagagaga	agaaaagagcg	gttcagcctg	atcctggaaa	gcgcgcac	caaccagacc	1200
agcatgtacc	tgtgtgccag	cagcagcatc	aacgagcagt	tcttcggccc	tggcaccaga	1260
ctgaccgtgc	tggaaagatct	gaagaacgtg	ttccccccag	aggtggccgt	gttcgagcct	1320
agcgaggccg	agatcagcca	cacccagaaa	gccaccctcg	tgtgcctggc	caccggcttc	1380
taccccgacc	acgtggaact	gtcttggtgg	gtcaacggca	aagaggtgca	cagcggcg	1440
tgcaccgacc	cccagccct	gaaagagcag	cccgcctga	acgacagccg	gtactgcctg	1500
agcagcagac	tgagagtgtc	cgccaccc	tggcagaacc	cccggaaacca	cttcagatgc	1560
caggtgcagt	tttacggcct	gagcgagaac	gacgagtgga	cccaggaccg	ggccaagccc	1620
gtgacc	caga	cgaggcctgg	ggcagagccg	attgcggctt	caccagcag	1680
agctaccagc	agggcgtgct	gagcgc	ccacc	agatcctgct	ggcaaggcc	1740
accctgtacg	ccgtgctgg	gtccgcctg	gtgctgatgg	ccatggtcaa	gagaaaggac	1800
agccggggct	ga					1812

&lt;210&gt; 127

5 &lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; péptido de VEB

&lt;400&gt; 127

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu

1

5

15

## REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado, estando el polinucleótido con codones optimizados, que codifica para una proteína de unión que comprende:

5 (a) un dominio variable de cadena  $\alpha$  ( $V_\alpha$ ) 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

10 (b) un dominio variable de cadena  $\beta$  ( $V_\beta$ ) 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,

15 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

20 (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

25 (a) la proteína de unión codificada comprende un dominio  $V_\alpha$  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  $V_\beta$  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

30 (b) la proteína de unión codificada comprende un dominio  $V_\alpha$  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  $V_\beta$  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

35 (c) el dominio  $V_\alpha$  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

40 (d) el dominio  $V_\alpha$  codificado comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 ó 2; y/o

(e) el dominio  $V_\beta$  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

45 (f) el dominio  $V_\beta$  codificado comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO.:9; y/o

50 (g) la proteína de unión codificada comprende el dominio  $V_\alpha$  codificado de (c) o (d) en combinación con el dominio  $V_\beta$  codificado de (e) o (f).

3. Polinucleótido aislado según la reivindicación 1 ó 2, en el que

55 (a) el dominio  $V_\alpha$  codificado comprende un dominio constante de cadena  $\alpha$  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  $V_\beta$  codificado comprende un dominio constante de cadena  $\beta$  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

60 (c) la proteína de unión codificada comprende una cadena  $\alpha$  de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO.:5-8 y una cadena  $\beta$  de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:12 ó 13, en la que preferiblemente

65 (c1) la proteína de unión codificada comprende una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en la

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

5 (c2) la proteína de unión codificada comprende una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:7 y una cadena  $\beta$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:12;

10 (c3) la proteína de unión codificada comprende una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6 y una cadena  $\beta$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:13;

o

15 (c4) la proteína de unión codificada comprende una cadena  $\alpha$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:8 y una cadena  $\beta$  de TCR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:13.

20 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.

25 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  $\gamma$ -retroviral.

30 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.

35 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.

40 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.

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

(a) codifica para el dominio  $V_{\alpha}$  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  $V_{\beta}$  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

50 (b) codifica para el dominio  $V_{\alpha}$  y comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:78 u 80; y/o

(c) codifica para el dominio  $V_{\beta}$  y comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.:89.

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

(a) el dominio  $V_{\alpha}$  que codifica para el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio constante de cadena  $\alpha$  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  $V_{\beta}$  que codifica para el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio constante de cadena  $\beta$  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.

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

65 (a) una cadena  $\alpha$  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  $\beta$  de TCR que codifica para el polinucleótido que comprende

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

5 (b) una cadena  $\alpha$  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  $\beta$  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  $\alpha$  de TCR que codifica para el polinucleótido y una cadena  $\beta$  de TCR que codifica para el polinucleótido, opcionalmente en la que el polinucleótido que codifica para la cadena  $\alpha$  de TCR, el péptido autoescindible y la cadena  $\beta$  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

15 (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

20 (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.

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

25 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.

30 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.

35 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.

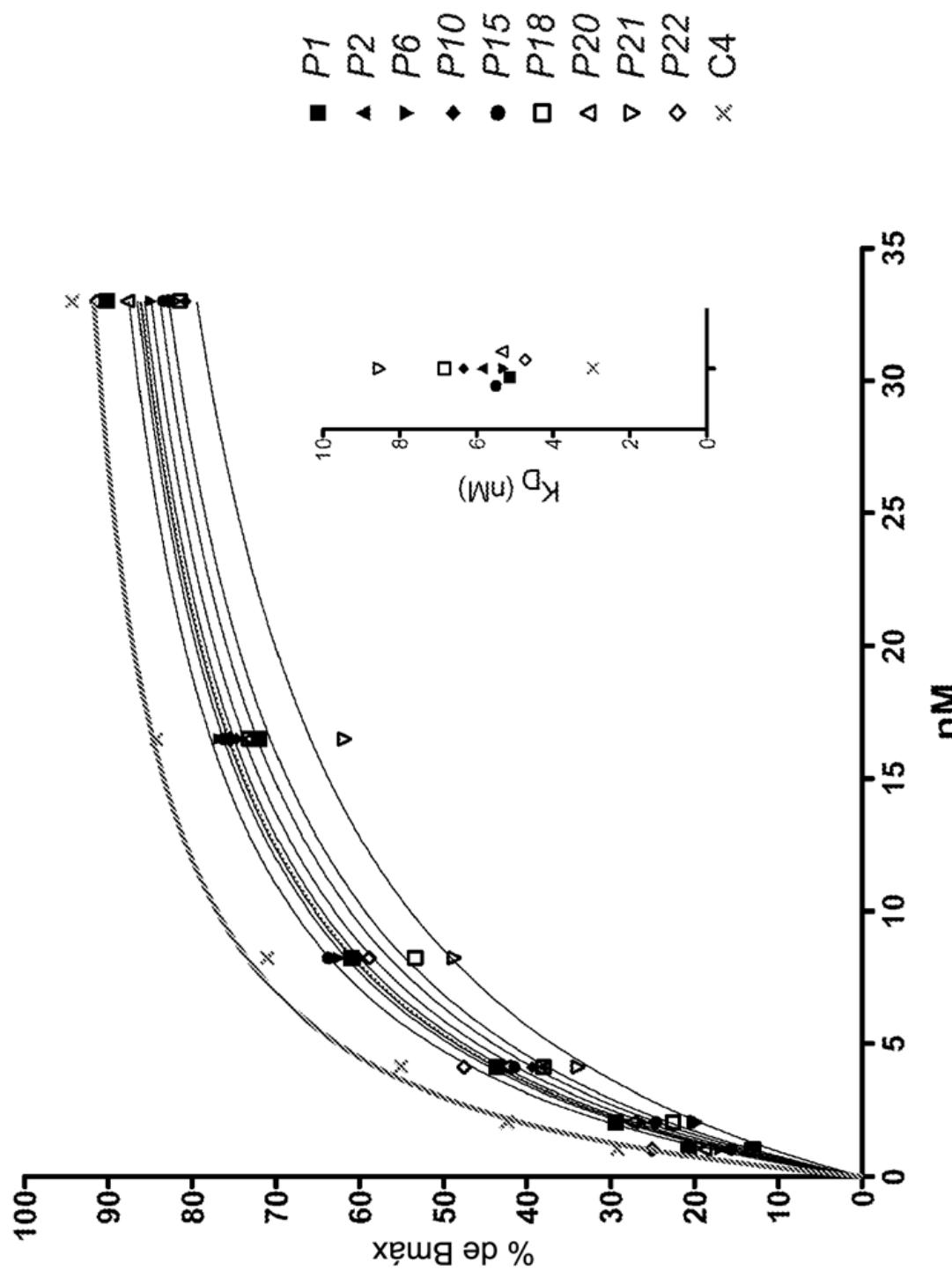
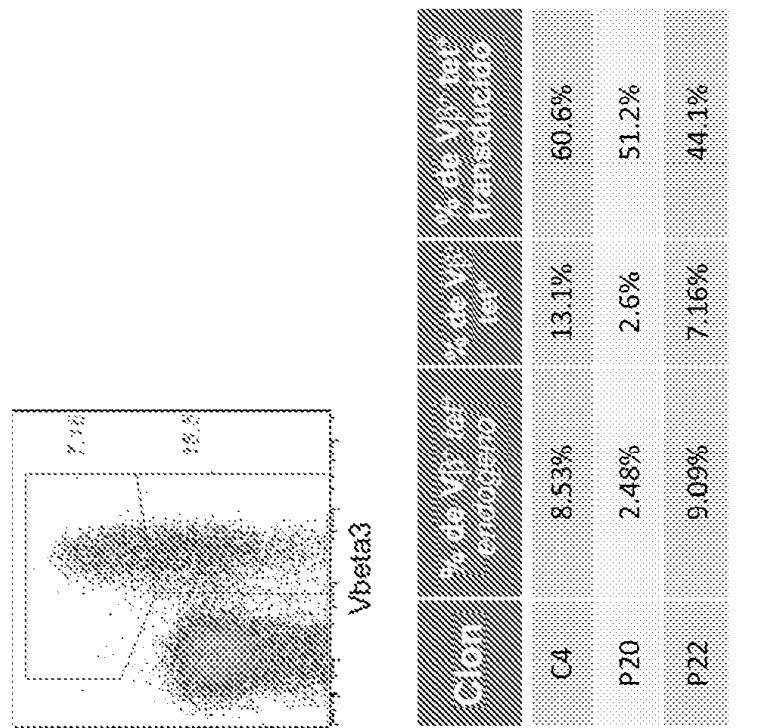
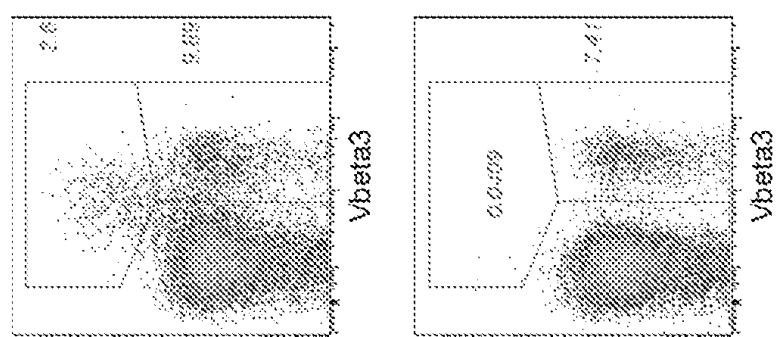


Fig. 1

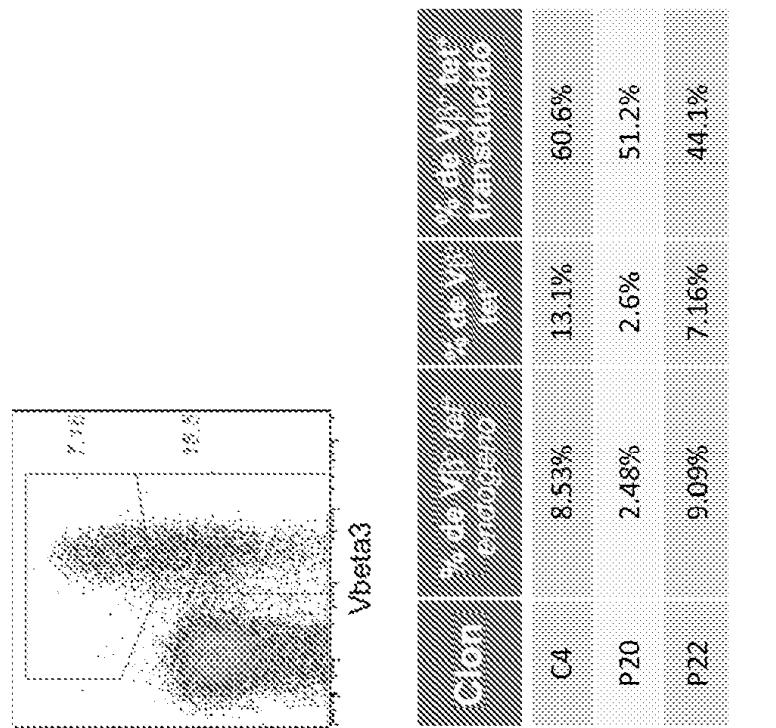
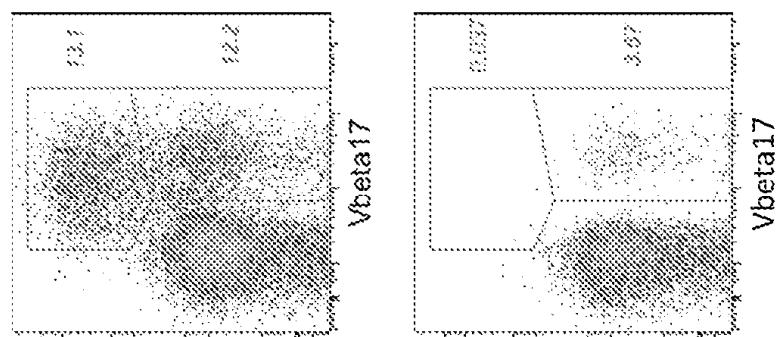
**A.** **P22**



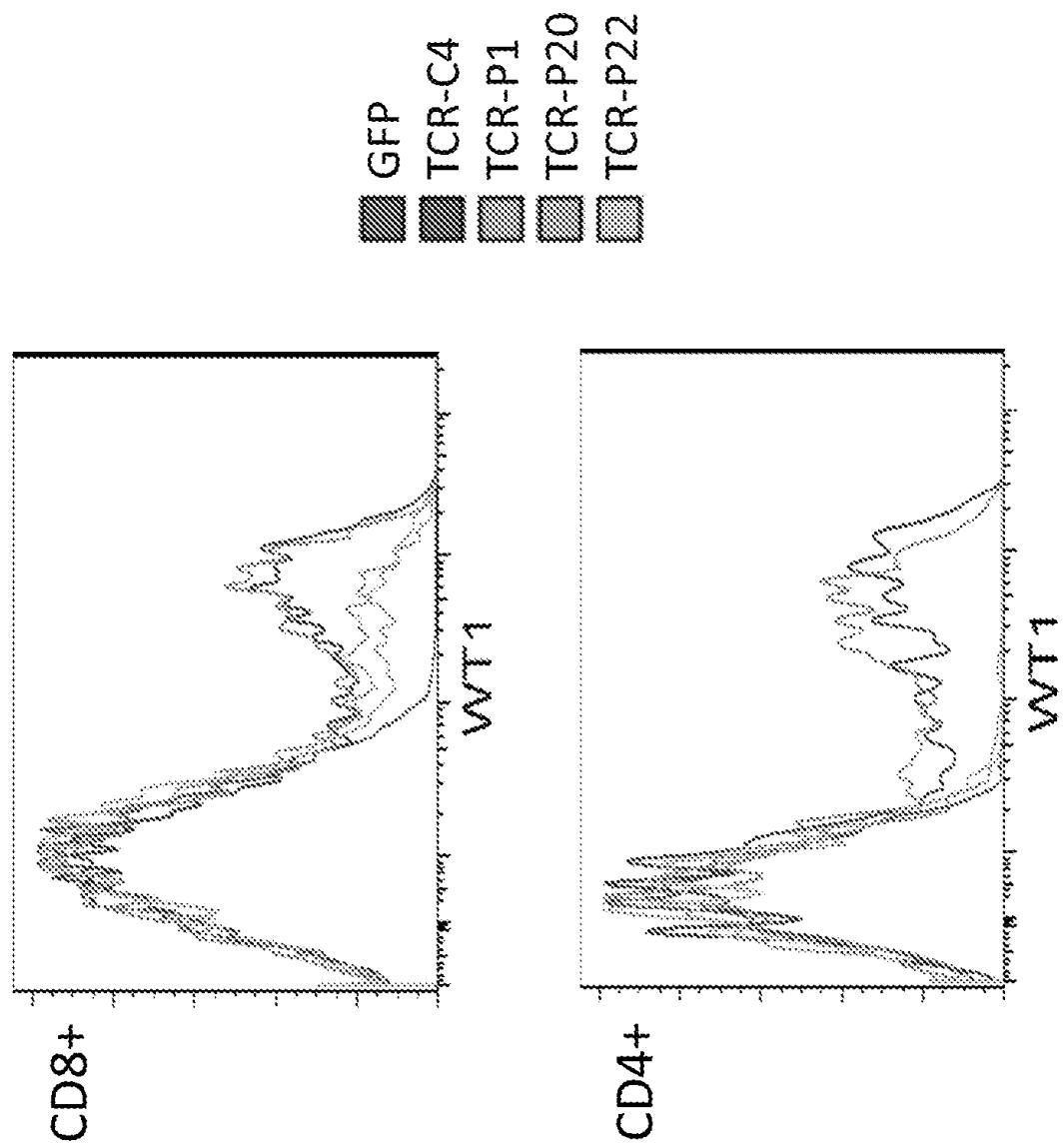
**P20**



**C4**

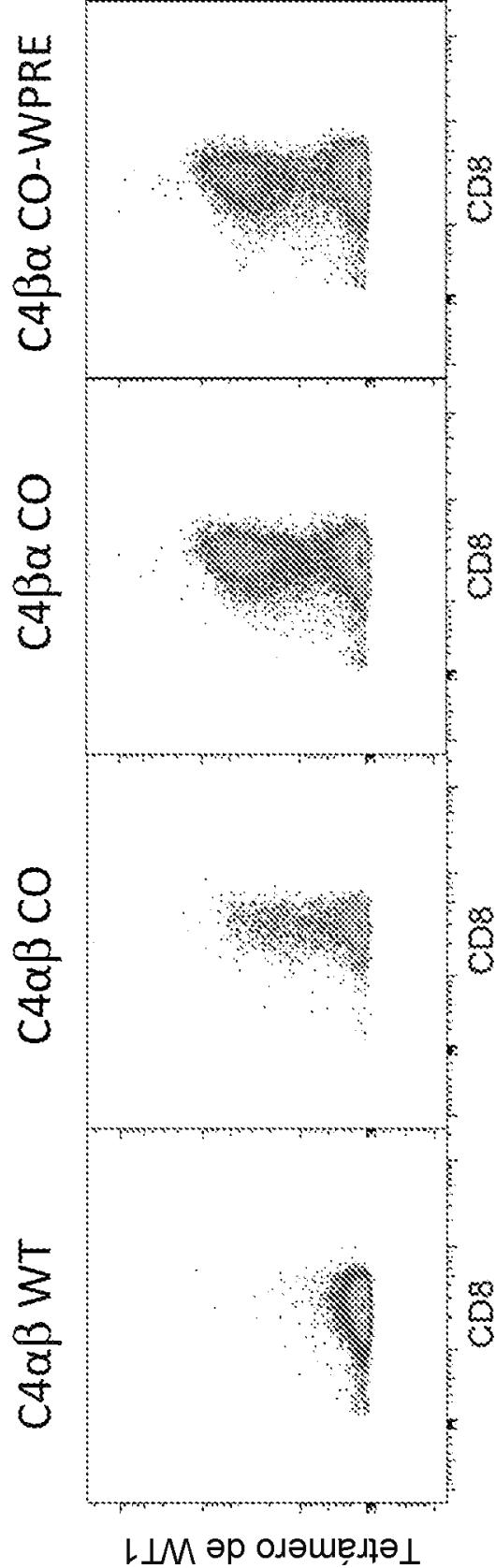


**Fig. 2A**

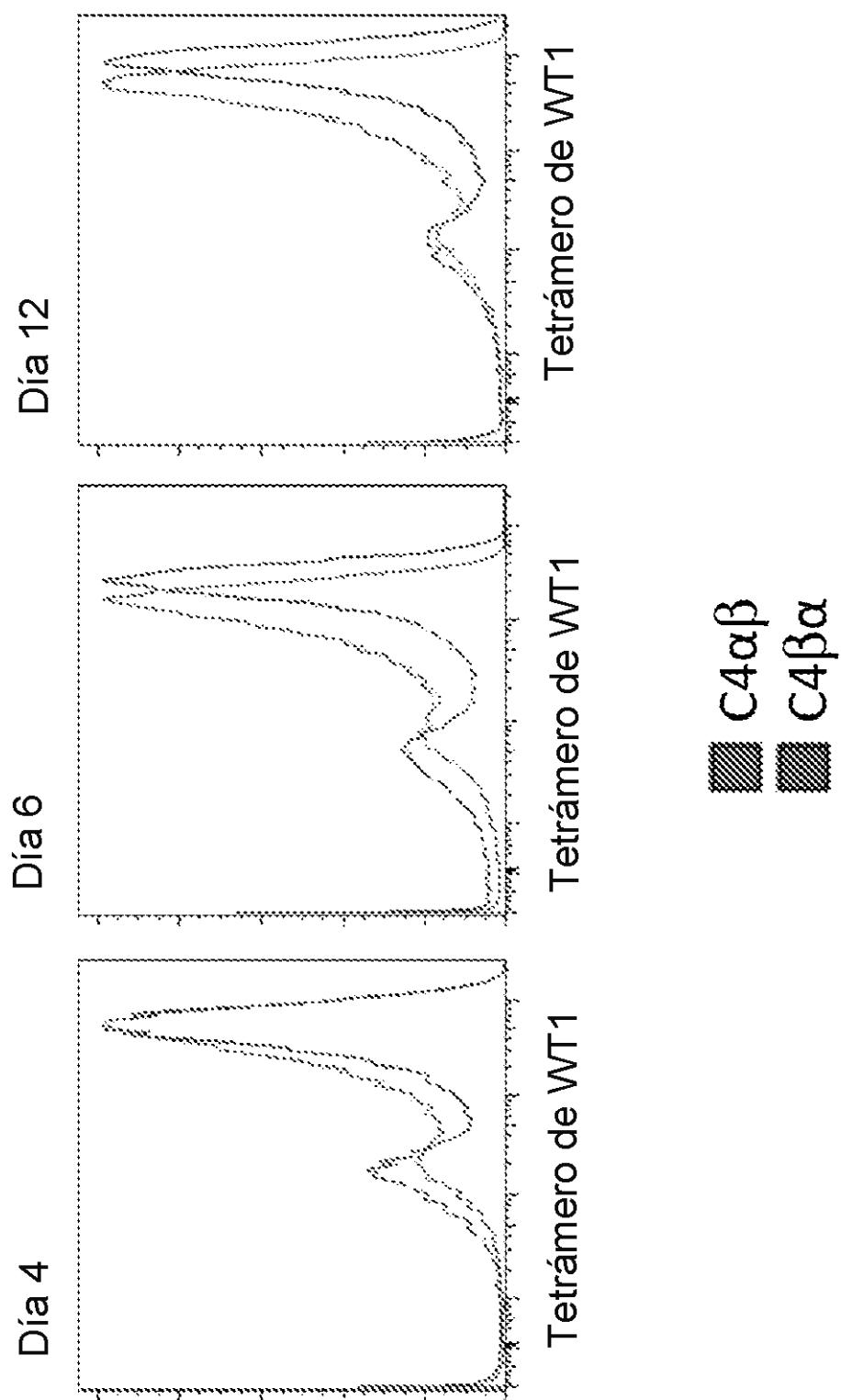


**Fig. 2B**

**A.**



**Fig. 3A**

**B.****Fig. 3B**

C.

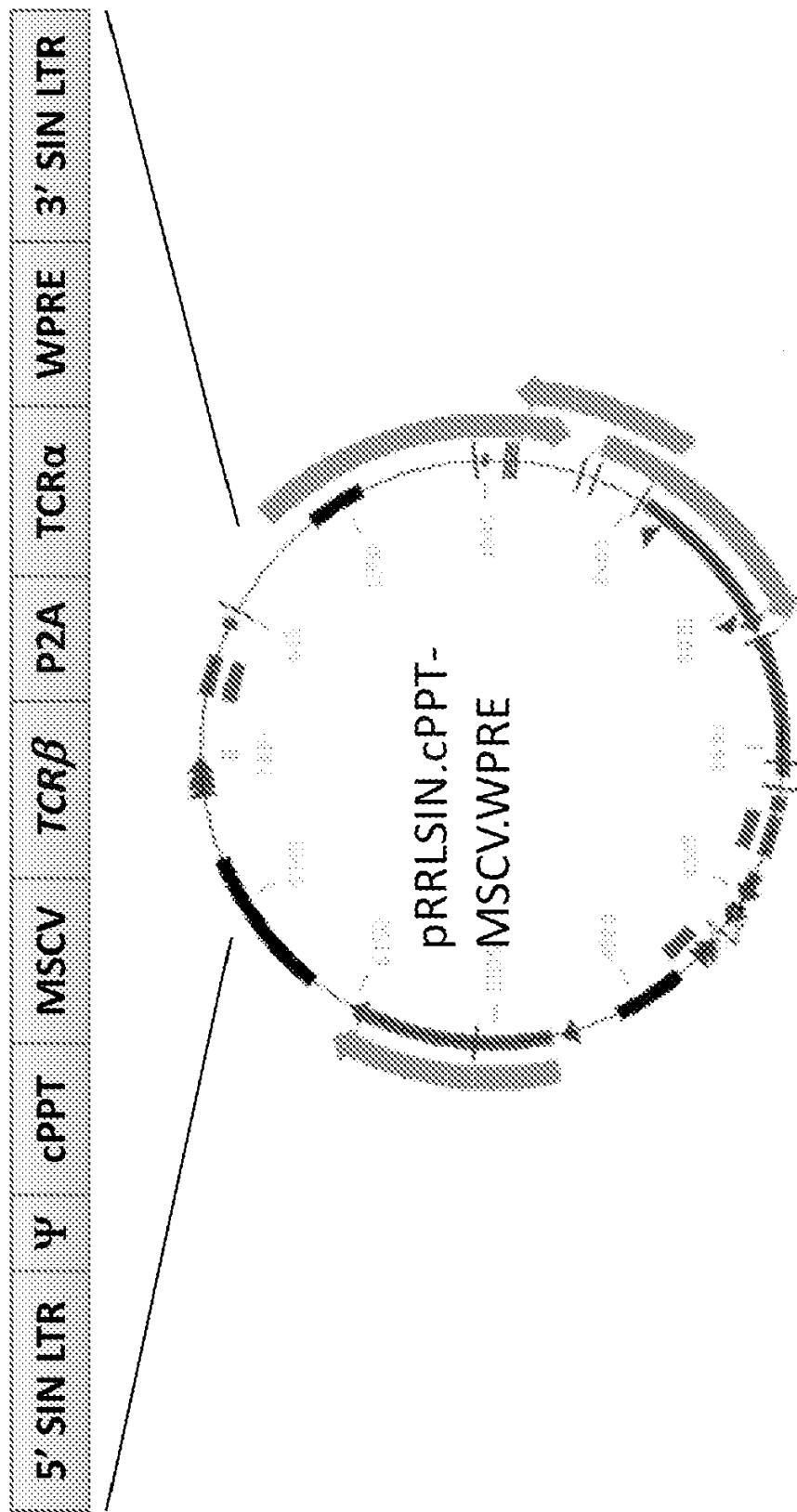


Fig. 3C

A.

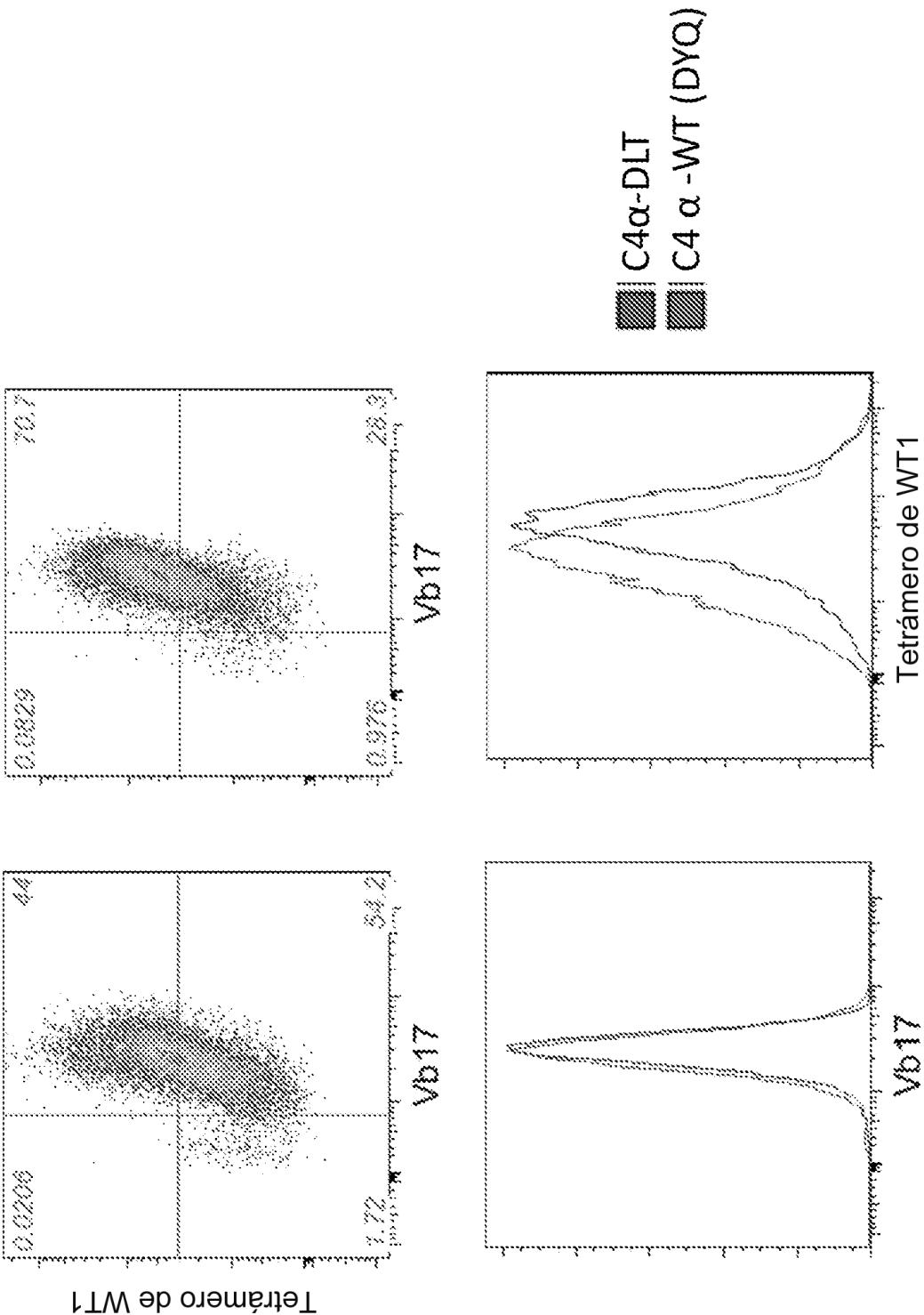
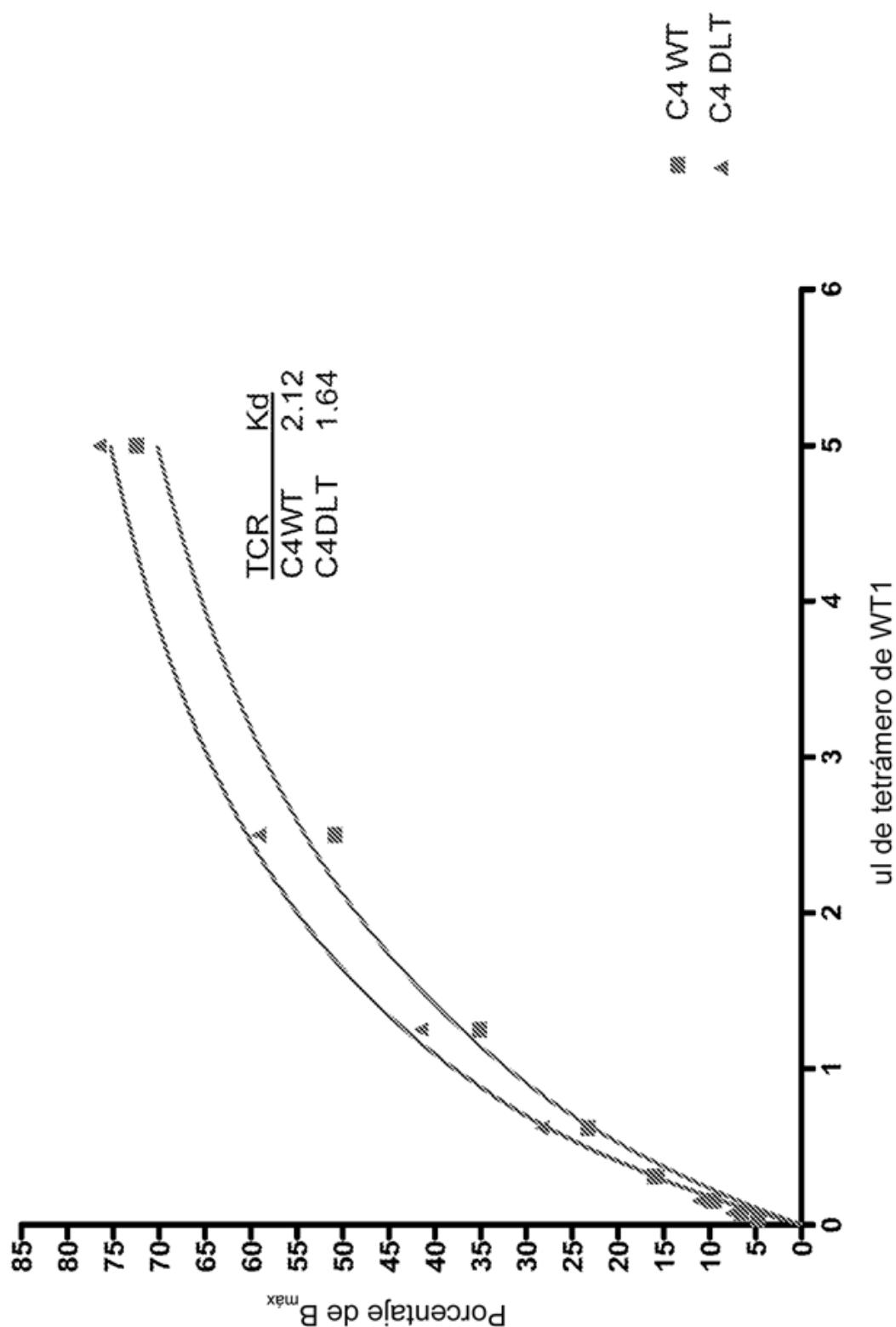


Fig. 4A

**Fig. 4B**

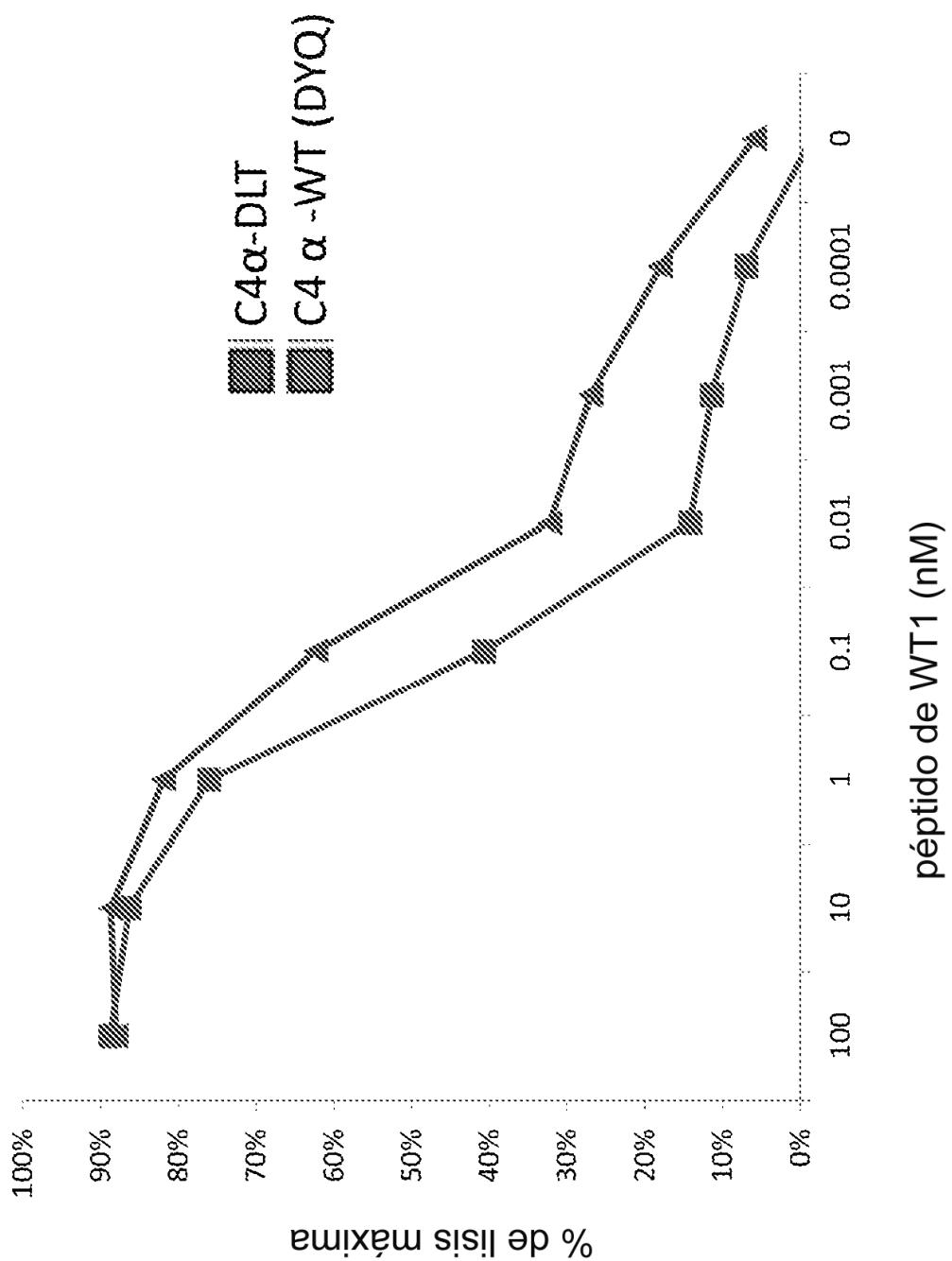
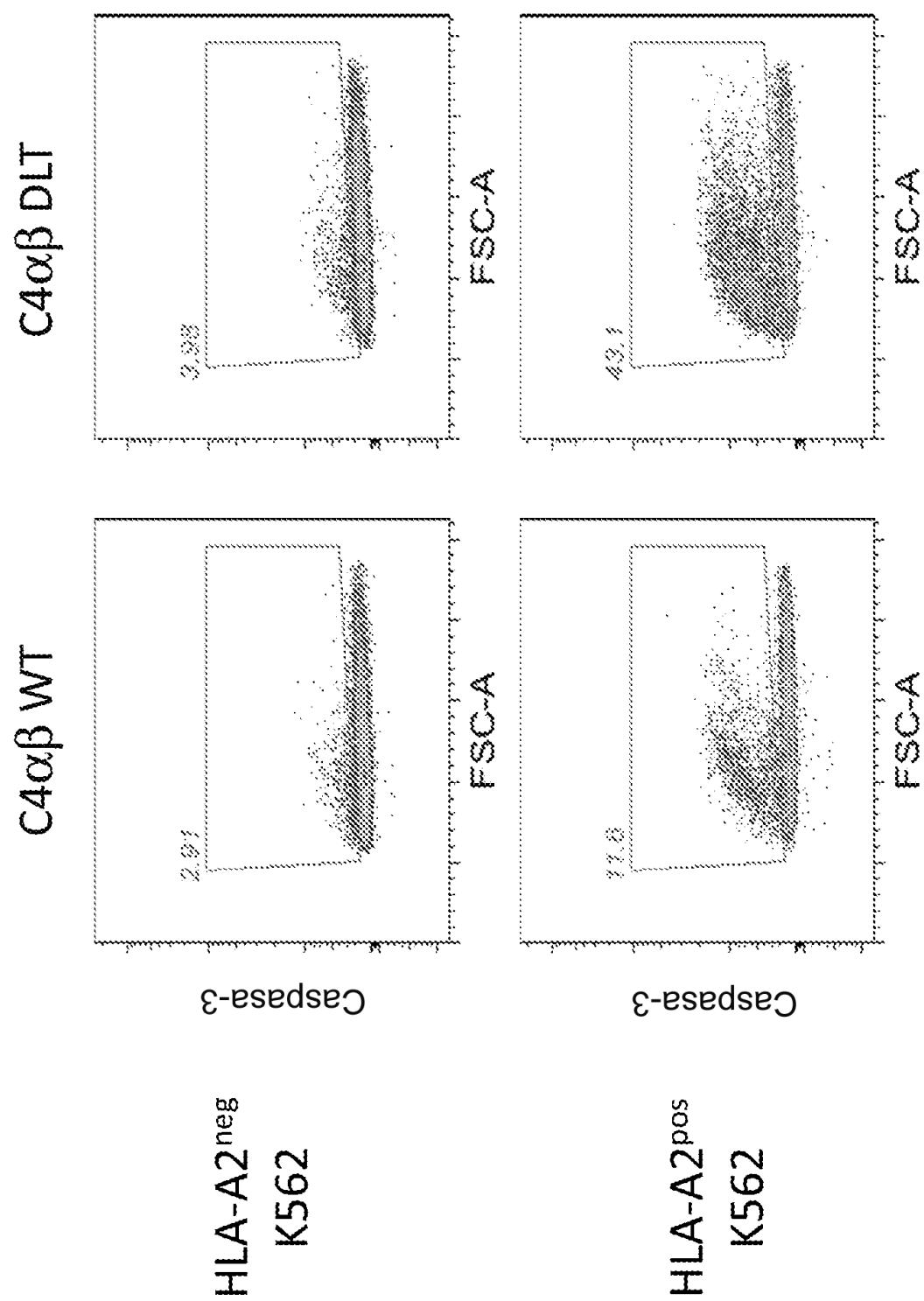
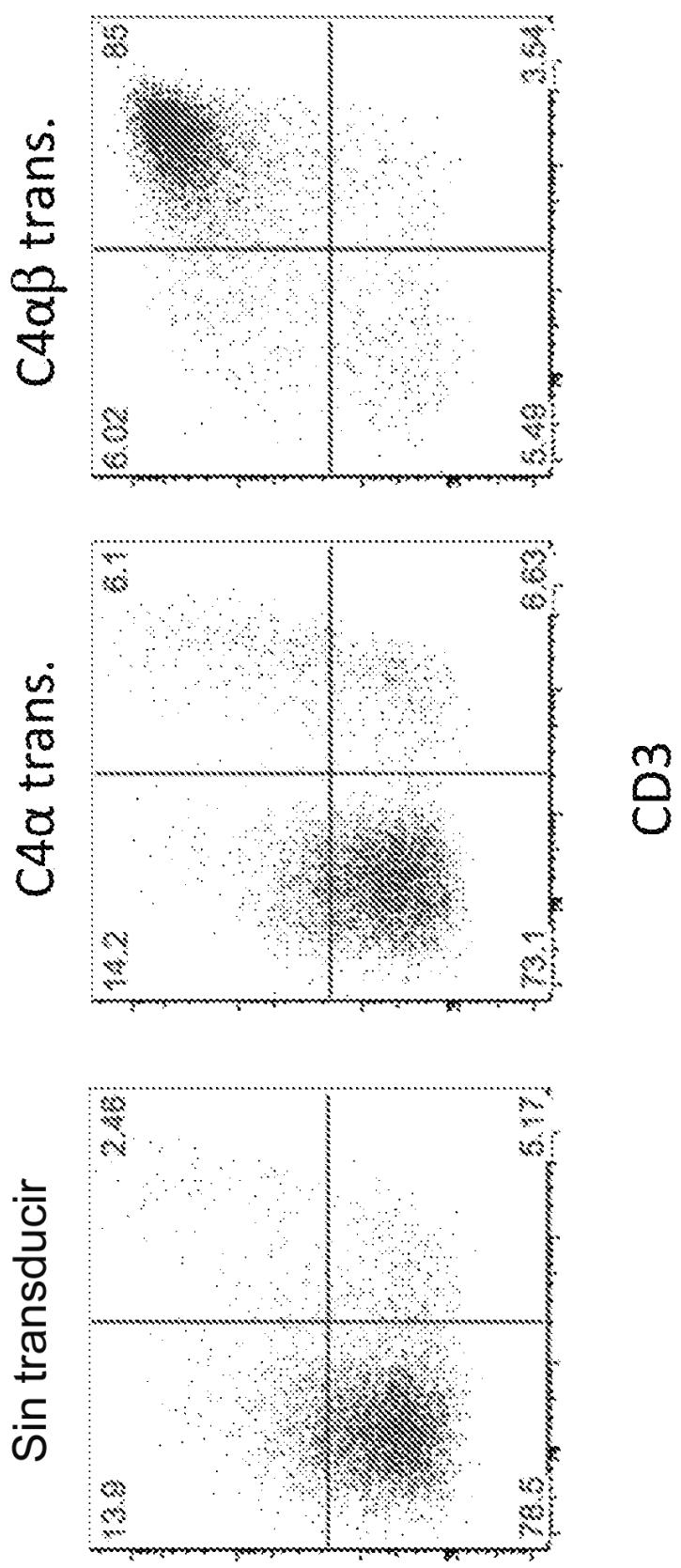


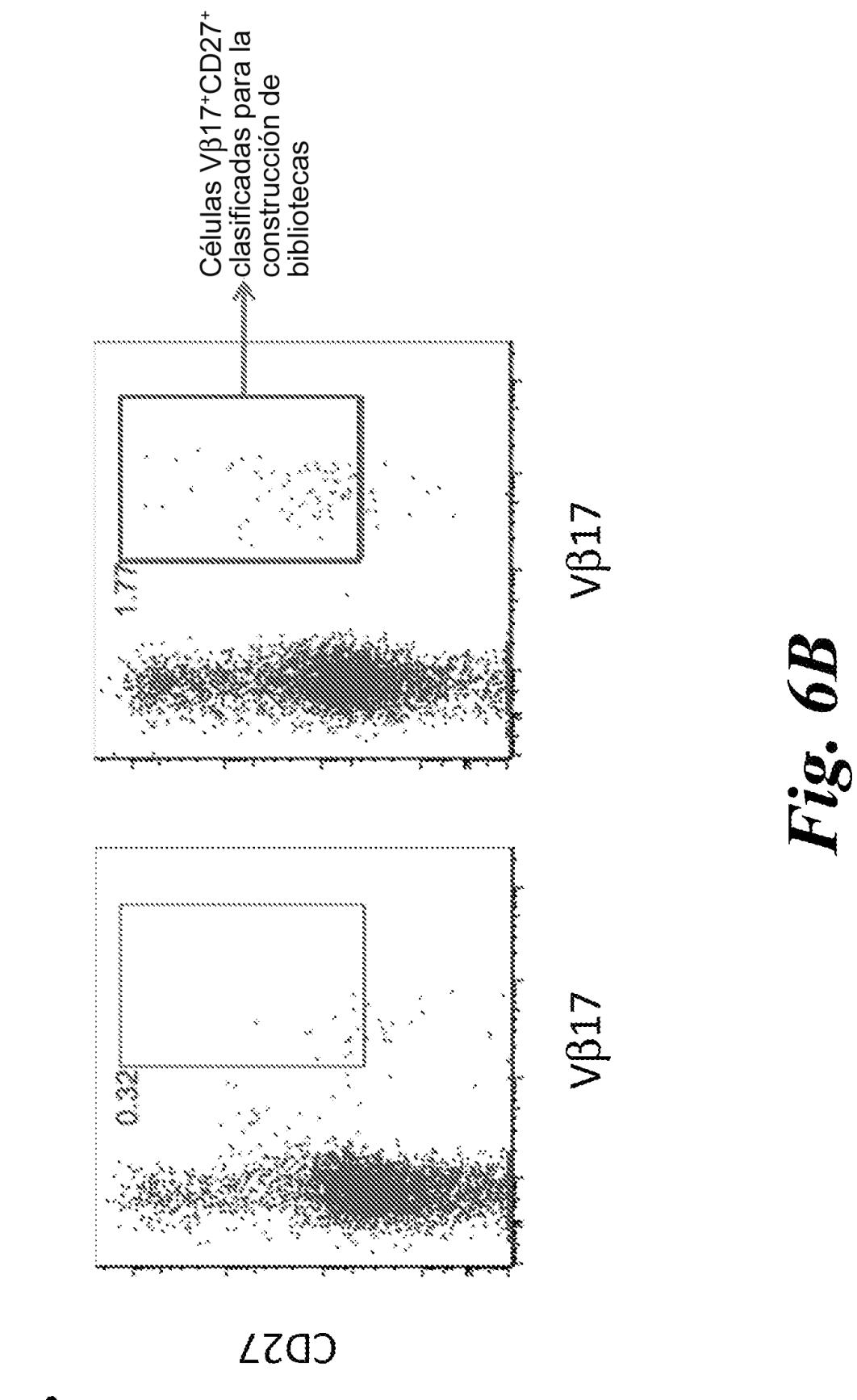
Fig. 4C

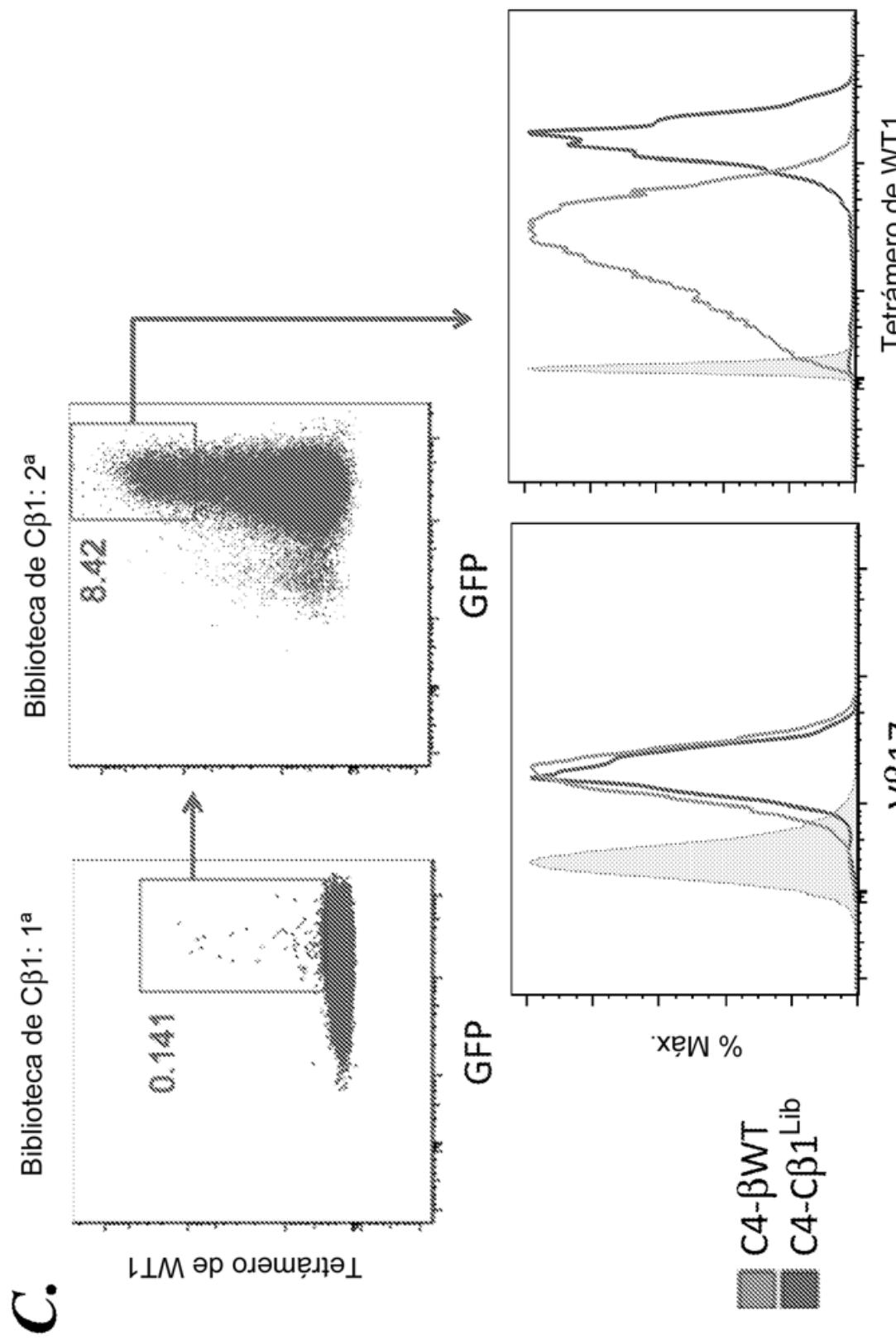


**Fig. 5**

A.

**Fig. 6A**





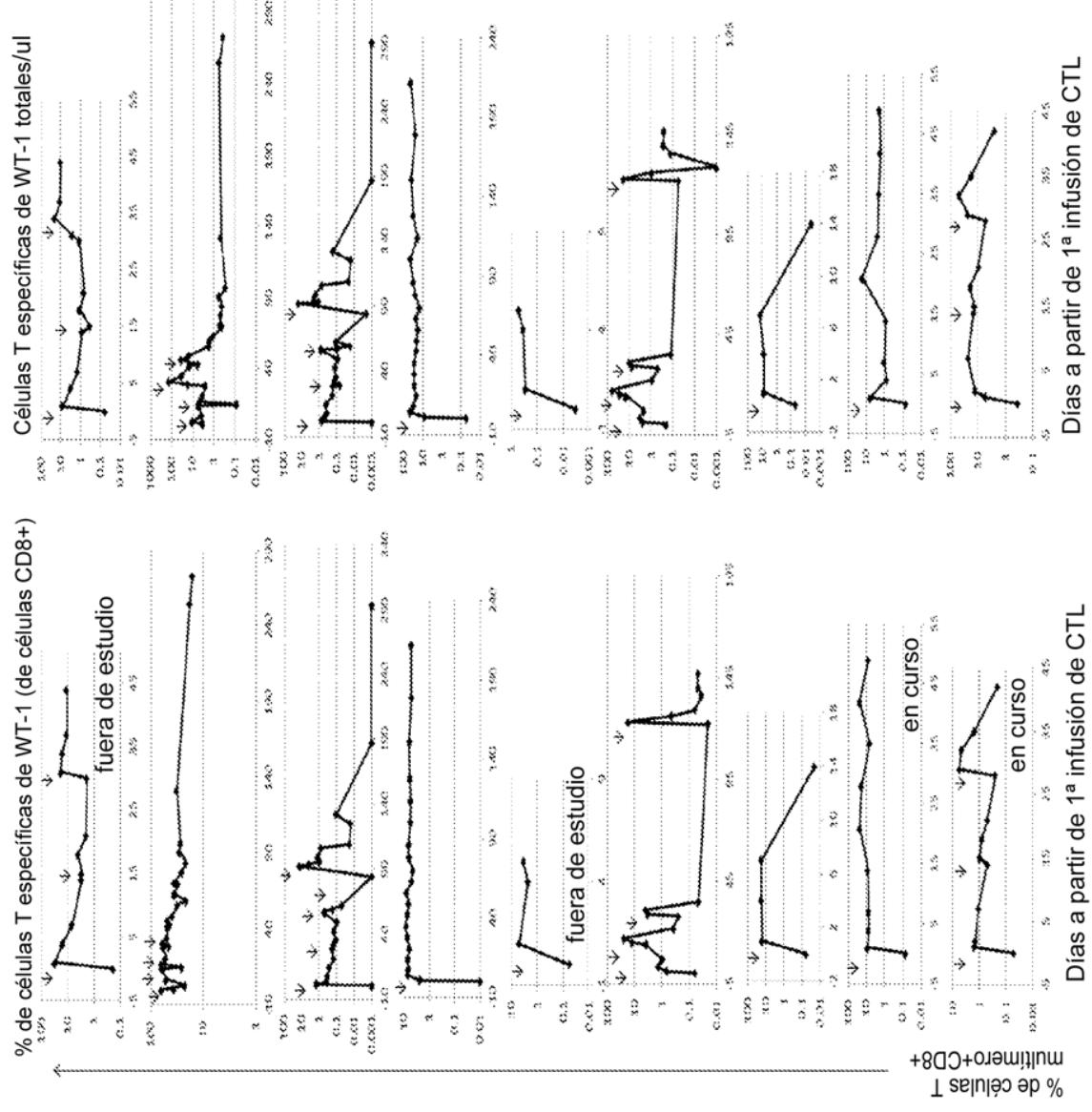


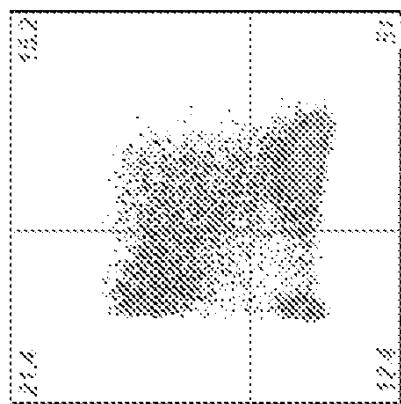
Fig. 7

**A.**

Día 0:  
Estim. con péptido  
de VEB

Día 1:  
Transducir con  
TCR C4

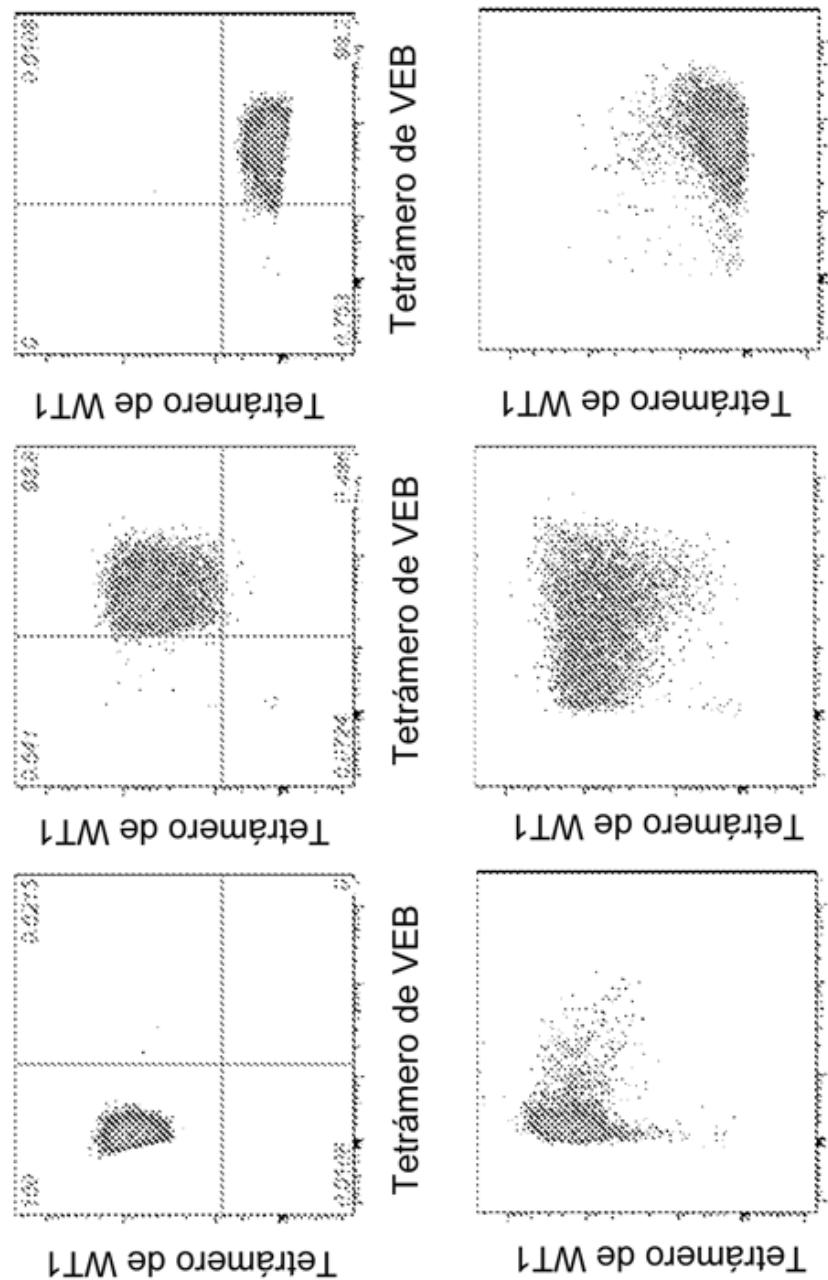
12 días

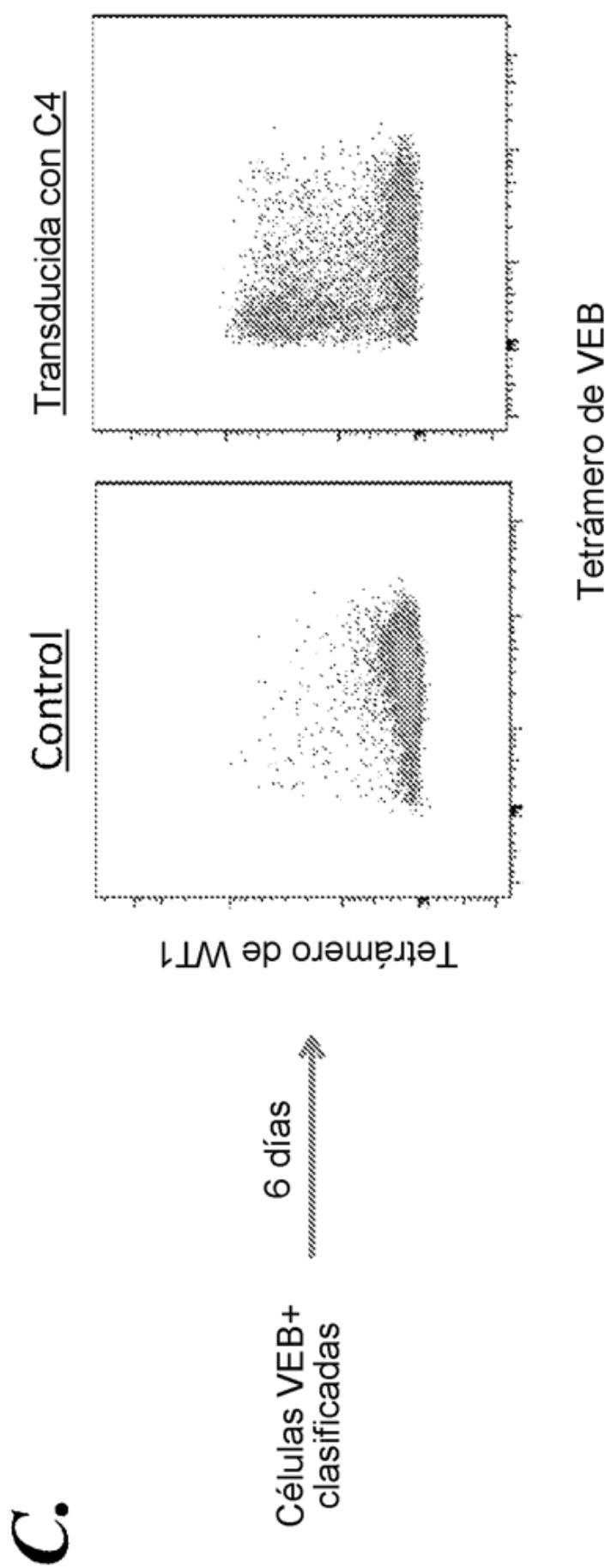


Tetramero de WT1

Tetramero de VEB

**Fig. 8A**

**B.**Después de la  
clasificación**Fig. 8B**



**Fig. 8C**