

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 838 750**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2015 PCT/US2015/047013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2015 E 15835755 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3186277**

54 Título: **Anticuerpos, composiciones y usos**

30 Prioridad:

27.08.2014 US 201462042457 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2021

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**CHEUNG, NAI-KONG, V.;
AHMED, MAHIUDDIN y
ZHAO, QI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 838 750 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos, composiciones y usos

Lista de secuencias

5 La presente memoria descriptiva hace referencia a una lista de secuencias (presentada electrónicamente como un archivo .txt nombrado como "2003080-0937_SL.txt" el 26 de agosto de 2015). Se generó el archivo .txt el 31 de julio de 2015 y tiene 129.896 bytes de tamaño. Todo el contenido de la lista de secuencias se incorpora al presente documento como referencia. La descripción de las secuencias a continuación enumera la identidad de las secuencias en la lista de secuencias.

Antecedentes

10 A menudo se crean tumores en un microentorno que suprime el sistema inmunitario. La eliminación de este bloqueo inmunológico ha sido el centro de atención de muchos esfuerzos para desarrollar terapias eficaces.

El documento US 7737258 B2 da a conocer un polipéptido que se une al mismo antígeno que el del anticuerpo monoclonal 8H9. El documento WO 2011/160119 A2 da a conocer anticuerpos anti-GD2 quiméricos, humanizados, madurados por afinidad, de estabilidad mejorada y biespecíficos y fragmentos de los mismos.

Sumario

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas y las siguientes realizaciones.

La presente invención proporciona un agente de anticuerpo IgG humanizado que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3, agente de anticuerpo que incluye un CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 que se exponen en SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 62, respectivamente (numeración de Kabat). Tales anticuerpos comparten una identidad de secuencia significativa con 8H9. Los anticuerpos proporcionados representan variantes humanizadas maduradas por afinidad de 8H9.

25 Los anticuerpos proporcionados se unen a un epítipo en B7H3 que reconoce 8H9. Entre otras cosas, la presente invención proporciona el conocimiento sorprendente de que m8H9, y variantes humanizadas del mismo, se unen a un epítipo distinto en B7H3 que no reconocen otros determinados anticuerpos contra B7H3. Por tanto, la presente invención define un conjunto útil de nuevos anticuerpos, aquellos que no son m8H9 pero que se unen al mismo epítipo.

La presente invención proporciona un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 e incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7 y 8, e incluye una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 15 y 16.

35 También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 9. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 1 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 9. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 2 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 10. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 2 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 10. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 3 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 11. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 3 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 11. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 4 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 12. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 4 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 12. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 2 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 11. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 2 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 11. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 3 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 10. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 3 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 5 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 5 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 13. También se da a conocer en el presente documento que la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 6 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 14. También se da a conocer en el presente documento que el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 6 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 7 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 7 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la cadena ligera de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 8 y la cadena pesada de inmunoglobulina se expone en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 8 y cadenas pesadas de inmunoglobulina expuestas en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, la cadena ligera de inmunoglobulina comprende un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34, y en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102.

La presente invención proporciona anticuerpo 8H9 murino, en el que las cadenas ligeras de inmunoglobulina incluye un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34, y en el que las cadenas pesadas de inmunoglobulina incluye un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos dados a conocer en el presente documento incluye uno o más de un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34 de la cadena ligera de inmunoglobulina, y un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102 de la cadena pesada de inmunoglobulina, o incluye una sustitución de aminoácidos homólogos de los mismos en cualquiera de estas posiciones.

En algunas realizaciones, una cadena ligera de inmunoglobulina se fusiona a un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento se conjuga con un agente terapéutico o agente de detección.

En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento, incluyendo anticuerpos, se conjuga con un radioisótopo, un conjugado de fármaco, una nanopartícula, una inmunotoxinas o cualquier otra carga útil.

En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento, incluyendo anticuerpos, se conjuga con un agente de diagnóstico o de formación de imágenes, o ambos.

En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo tiene una especificidad primera y segunda, y la primera especificidad se une a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 y la segunda especificidad se une a CD3 en células T o DOTA.

La presente invención proporciona un scFv que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 e incluye el polipéptido expuesto en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27.

En algunas realizaciones, un polipéptido de un scFv incluye una treonina en la posición 24, una glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56, un residuo de glicina en la posición 102, un residuo de treonina en la posición 153 y un residuo de tirosina en la posición 167.

En algunas realizaciones, un scFv incluye uno o más de una treonina en la posición 24, una glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56, un residuo de glicina en la posición 102, un residuo de treonina en la posición 153 y un residuo de tirosina en la posición 167, o incluye una sustitución de aminoácidos homólogos de los mismos en cualquiera de estas posiciones.

En algunas realizaciones, un polipéptido de un scFv se fusiona a un segundo polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones, el scFv se conjuga con un agente terapéutico o agente de detección.

En algunas realizaciones, cualquiera de los scFv dados a conocer en el presente documento forma parte de un receptor de antígeno quimérico.

La presente invención proporciona un agente de anticuerpo que se une específicamente al epítipo expuesto en SEQ ID NO: 32 ubicado en el bucle FG en el dominio V de la proteína 2Ig-B7H3 y en los dominios V1 y V2 de la

proteína 4Ig-B7H3, agente de anticuerpo que no es m8H9.

La presente invención proporciona un agente de anticuerpo que se une específicamente al bucle FG en el dominio V de la proteína 2Ig-B7H3 y en los dominios V1 y V2 de la proteína 4Ig-B7H3 con una K_D de menos de 2 nM, agente de anticuerpo que no es m8H9.

- 5 En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento suprime un efecto inhibidor de B7H3 sobre la proliferación y función de células T.

En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento suprime un efecto inhibidor de B7H3 sobre la actividad y función de linfocitos citolíticos naturales (células NK).

- 10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye cualquiera de los agentes de anticuerpo, scFv o anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos dados a conocer en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 15 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer, que incluye administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera o más de los agentes de anticuerpo, scFv, anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos dados a conocer en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un método de modulación del sistema inmunitario, que incluye administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera o más de los agentes de anticuerpo, scFv, anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos dados a conocer en el presente documento.

- 20 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer, incluyendo el método etapas de administrar a un sujeto una composición que incluye un agente de anticuerpo anti-B7H3 que se une al bucle FG de B7H3.

En algunas realizaciones, el cáncer es o incluye un neuroblastoma. En algunas realizaciones, el cáncer es o incluye un cáncer de cuello uterino. En algunas realizaciones, el cáncer incluye células tumorales positivas para B7H3.

- 25 La presente divulgación proporciona un método de potenciación de la citotoxicidad mediada por células T en un sujeto, incluyendo el método etapas de administrar a un sujeto una composición que incluye un agente de anticuerpo anti-B7H3 que se une al bucle FG de B7H3.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es o incluye un agente de anticuerpo 8H9.

- 30 En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 39, 40, 45, 46, 51 y 52.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 y 54.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 y 56.

- 35 En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 y 76.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60, 66, 72 y 78.

- 40 En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 68, 74 y 80.

- 45 En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 39, 40, 45, 46, 51 y 52; una secuencia de CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 y 54; y una secuencia de CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 y 56.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 y 76; una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60, 66, 72 y 78; y una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 68, 74 y 80.

- 50 En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo 8H9 incluye un polipéptido que incluye una secuencia de CDR1

- de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 39, 40, 45, 46, 51 y 52; una secuencia de CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 y 54; y una secuencia de CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 y 56; y una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 y 76; una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60, 66, 72 y 78; y una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 68, 74 y 80.
- En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento incluye o consiste en un anticuerpo 8H9 o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo 8H9 es o comprende m8H9, h8H9 o ham8H9.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo 8H9 comprende una cadena pesada tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 13, 15 y 16 y una cadena ligera tal como se expone en una de las SEQ ID NO: 5, 7 y 8.
- En algunas realizaciones, cualquiera de los agentes de anticuerpo dados a conocer en el presente documento compete con un anticuerpo 8H9 por la unión a B7H3.
- La presente invención proporciona un ADN o ARN que codifica para cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos de la invención.
- La presente invención proporciona una célula que expresa cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos de la invención.
- La presente invención proporciona un método *in vitro* de preparación de una célula que expresa un agente de anticuerpo o fragmento del mismo, que incluye transfectar o transducir viralmente la célula con un ADN o ARN que codifica para cualquiera de los agentes de anticuerpo de la invención.
- En algunos aspectos de la divulgación, la célula se transduce viralmente dentro de un paciente.
- En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria.
- En algunas realizaciones, la célula es una célula presentadora de antígeno.
- En algunas realizaciones, la célula es una célula T. En algunas realizaciones, la célula es un linfocito citolítico natural.
- La presente invención proporciona una vacuna que incluye cualquiera de los ADN o ARN de la invención.
- La presente divulgación proporciona un método de vacunación de un paciente, que incluye administrar cualquiera de las vacunas dadas a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.
- En algunas realizaciones, el paciente es un cánido o un félido.
- La presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico que incluye cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos de la invención.
- En algunas realizaciones, un ADN o ARN codifica para un receptor de antígeno quimérico.
- La presente invención proporciona una célula que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de la invención (por ejemplo, una célula T o un linfocito citolítico natural).
- La presente invención proporciona un método de preparación de una célula que incluye transfectar o transducir viralmente una célula con cualquiera de los ADN o ARN de la invención.
- La presente divulgación proporciona un método de terapia celular adoptiva, que incluye una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células dadas a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.
- La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente mediante la selección como diana de un epítipo de péptido expuesto en SEQ ID NO: 32, que incluye administrar cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos dados a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.
- En algunas realizaciones, el paciente se selecciona del grupo de un ser humano, un perro, un gato, un chimpancé, un orangután, un gibbon, un macaco, un titi, un cerdo, un caballo, un panda y un elefante.
- La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente que incluye administrar cualquiera de las células dadas a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.

La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente que incluye administrar un virus que incluye un ADN o ARN que codifica para cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos dados a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.

- 5 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente mediante radioinmunoterapia compartimental (cRIT, por sus siglas en inglés), que incluye administrar cualquiera de los agentes de anticuerpo o fragmentos de los mismos dados a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra por vía intratecal, por vía intraperitoneal o mediante administración potenciada por convección.

Breve descripción del dibujo

- 10 El dibujo incluido en el presente documento, que se compone de las siguientes figuras, es sólo con propósitos de ilustración, no de limitación.

La figura 1 muestra un diagrama de cintas de la estructura cristalina del Fab de ch8H9. A: Vista lateral de Fab que muestra los dominios de Ig individuales y la región determinante de complementariedad (CDR). B: Vista de arriba abajo en el sitio de unión a antígeno, que muestra la orientación de los 6 bucles de CDR. C: El potencial electrostático de superficie del sitio de unión a antígeno se transformó de cargado negativamente (color rojo) a cargado positivamente (color azul) en un intervalo de -1 a +1 kT/e.

- 15 La figura 2 ilustra una estrategia proporcionada para desarrollar anticuerpos 8H9 humanizados y madurados por afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

La figura 3 muestra la cinética de la unión de anticuerpos IgG 8H9 murinos (m8H9) y 8H9 quiméricos ratón/humano (ch8H9) a 2Ig-B7H3-Fc determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

- 20 La figura 4 muestra los resultados de un ELISA en el que una variedad de concentraciones de ch8H9 y de las variantes de IgG 8H9 humanizadas H1L1, H1L2, H2L1 y H2L2 se unieron a 4Ig-B7H3.

La figura 5 muestra la detección mediante ELISA del antígeno B7H3-mFc biotinilado mediante HRP-estreptavidina (A) o IgG ch8H9 (B) con dilución en serie.

- 25 La figura 6 muestra datos de citometría de flujo asociados con la maduración por afinidad de scFv de H3L3 de 8H9 humanizado (hu).

La figura 7 muestra una comparación de células de levadura que presentan scFv de H3L3 de 8H9 (izquierda) y células de levadura derivadas de la última/séptima tanda de clasificación celular (derecha). Las células de levadura se tiñeron con 0,1 o 1 µg/ml de B7H3-mFc y luego se detectaron mediante un APC-anticuerpo de cabra anti-ratón.

- 30 La figura 8 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos para variantes de Fv de cadena sencilla (scFv) de hu8H9 derivadas de la séptima tanda de clasificación celular tal como se describe. Los datos de secuencia de agentes de unión fuertes se agruparon mediante análisis de agrupaciones. Se seleccionaron repetidamente las siguientes cinco variantes de scFv: S7.2, S7.17, S7.22, S7.28 y S7.29. S3.3 es el scFv derivado de la tercera tanda de clasificación celular. H3L3 de 8H9 (SEQ ID NO: 87); 8H9S3.3 (SEQ ID NO: 88); 8H9S7.2 (SEQ ID NO: 89);
35 8H9S7.3 (SEQ ID NO: 90); 8H9S7.4 (SEQ ID NO: 91); 8H9S7.5 (SEQ ID NO: 92); 8H9S7.6 (SEQ ID NO: 93); 8H9S7.7 (SEQ ID NO: 94); 8H9S7.8 (SEQ ID NO: 95); 8H9S7.9 (SEQ ID NO: 96); 8H9S7.17 (SEQ ID NO: 97); 8H9S7.18 (SEQ ID NO: 98); 8H9S7.19 (SEQ ID NO: 99); 8H9S7.20 (SEQ ID NO: 100); 8H9S7.21 (SEQ ID NO: 101); 8H9S7.22 (SEQ ID NO: 102); 8H9S7.27 (SEQ ID NO: 103); 8H9S7.28 (SEQ ID NO: 104); 8H9S7.29 (SEQ ID NO: 105).

- 40 La figura 9 muestra los resultados de experimentos de ELISA en los que se unieron variantes de scFv de hu8H9 a 4Ig-B7H3 (izquierda) y 2Ig-B7H3 (derecha).

La figura 10 muestra los resultados de experimentos en los que se unieron variantes de scFv de hu8H9 a células de neuroblastoma M14. Las células tumorales se tiñeron con 1 µg/ml de H3L3 de scFv de hu8H9 (color azul), S3.3 (color naranja), S7.22 (color verde) o control de isotipo (color rojo) y un anticuerpo anti-his. La unión se cuantificó mediante citometría de flujo.

- 45 La figura 11 muestra la cinética de unión por los anticuerpos IgG H1L2, H3L3, 3.1 y 5.1 de ch8H9 y hu8H9 a 4Ig-B7H3-Fc determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

La figura 12 muestra la cinética de la unión por los anticuerpos IgG H1L2, H3L3, 3.1 y 5.1 de ch8H9 y hu8H9 a 2Ig-B7H3-mFc determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

- 50 La figura 13 muestra los resultados de experimentos en los que se unieron variantes de IgG ch8H9 y hu8H9 a células de neuroblastoma M14. La unión se cuantificó mediante citometría de flujo.

La figura 14 muestra la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) *in vitro* de constructos de anticuerpo 8H9 contra células de neuroblastoma LAN-1 B7-H3(+), usando PBMC humanas como células efectoras. La citotoxicidad se midió mediante la liberación de ⁵¹Cr.

5 La figura 15 muestra la biodistribución de agentes de anticuerpos 8H9 marcados con ¹³¹I inyectados en ratones desnudos atímicos con xenoinjertos de tumores de neuroblastoma LAN-1 subcutáneo.

La figura 16 muestra una presentación gráfica de la unión simulada entre ch8H9 y huB7H3. IRDF (SEQ ID NO: 32) se indica con una flecha.

10 La figura 17 muestra la cinética de unión por los anticuerpos IgG anti-B7H3 ch8H9, MIH42, 6A1 y el clon 185504 a los mutantes de 2lg-B7H3-mFc y 2lg-B7H3-mFc silvestre R127A y D128A determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

La figura 18 muestra la cinética de unión de los anticuerpos IgG anti-B7H3 3.1 y 5.1 de hu8H9 a los mutantes de 2lg-B7H3-mFc y 2lg-B7H3-mFc silvestre R127A y D128A determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

15 La figura 19 muestra los resultados de experimentos en los que se midió la proliferación de células T en presencia de perlas activadoras de CD3/CD8 y en presencia o ausencia de células de neuroblastoma IMR-32 positivas para B7H3.

La figura 20 muestra los resultados de experimentos en los que se midió la proliferación de células T en presencia de perlas activadoras de CD3/CD8 y células de neuroblastoma IMR-32 positivas para B7H3, y concentraciones crecientes de ch8H9.

20 La figura 21 muestra los resultados de experimentos en los que se midió la citotoxicidad mediada por células T con respecto a células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa). Las células de carcinoma se habían tratado previamente con un anticuerpo biespecífico Her2xCD3 solo, o con este anticuerpo y adicionalmente IgG m8H9.

Breve descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 (cadena ligera de ch8H9) es

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRF
SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO: 2 (cadena ligera de L1 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRCASQSSISDYLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPAR
FSGSGSGTEFTLTISVQPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 3 (cadena ligera de L2 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRCASQSSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPARF
SGSGSGTEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 4 (cadena ligera de L3 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPARF
SGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
30 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5 (cadena ligera de 3.1 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSSISDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPARF
SGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 6 (cadena ligera de 4.1 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSSISDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIPAR
FSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 7 (cadena ligera de 5.1 de hu8H9) es

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLS CRASQSSISDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSSISGIPAR
FSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO: 8 (cadena ligera de 6.1 de ch8H9; ch8H9 + 6 mutaciones de maduración por afinidad) es

DIVMTQSPATLSVTPGDRVTLS CRASQSSISDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSR
FSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9 (cadena pesada de ch8H9) es

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLT TDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGT LVTV
SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO: 10 (cadena pesada de H1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLT TDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAYWGQGT LVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (cadena pesada de H2 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSRLTSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12 (cadena pesada de H3 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO: 13 (cadena pesada de 3.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 14 (cadena pesada de 4.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGRVTMTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 SEQ ID NO: 15 (cadena pesada de 5.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16 (cadena pesada de 6.1 de ch8H9; ch8H9 + 6 mutaciones de maduración por afinidad) es

QVQLQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLT
SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17 (scFv de H3L3 de 8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLT
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSDYLYHWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 18 (scFv de clon S3.3 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLT
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSDYLYHWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 19 (scFv de clon S7.2 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASCKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLT
SSGGGGSGGGGSGGGVSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSIGDYLYHWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 20 (scFv de clon S7.17 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWVGVWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTSTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQPSIDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGYSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 21 (scFv de clon S7.22 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRPEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSISDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 22 (scFv de clon S7.28 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLGSEDTAVYFCTRQTTATWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSSGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIGDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

5

SEQ ID NO: 23 (scFv de clon S7.29 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYLELSSLGSEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSISDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 24 (scFv de 3.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSISDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

10

SEQ ID NO: 25 (scFv de 4.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPQEGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGRVTMTDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAYWGQGTLLTV
VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSISDYLHWYQQKSH
QAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTK
LELKR

SEQ ID NO: 26 (scFv de 5.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGRVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAFWGQGTLLVT
VSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSSIDYLYWYQQKSH
QAPRLLIKIASQSSIGIPARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTK
LELKR

SEQ ID NO: 27 (scFv de 6.1 de ch8H9) es

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAFWGQGTLLVT
SAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSCRASQSSIDYLYWYQQKSH
ESPRLLIKIASQSSIGIPSRFSGSGSGSDFTLISNSVEPEDVGYYCQNGHSFPLTFGAGTK
LELKR

SEQ ID NO: 28 (scFv de huOKT3 (anti-CD3) de ligador) es

GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG
KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRLPEDTGYYFCARYYD
DHYCLDYWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS
SSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYY
CQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

5

SEQ ID NO: 29 (scFv de C825 (anti-DOTA) de ligador) es

GGGGSGGGGSGGGGSHVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVWISGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSY
PYNFYDAWGCGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSST
GAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDE
AIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

SEQ ID NO: 30 (scFv de huOKT3 (anti-CD3) de ligador) es

GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG
KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRLPEDTGYYFCARYYD
DHYCLDYWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS
SSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYY
CQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

10

SEQ ID NO: 31 (scFv de C825 (anti-DOTA) de ligador) es

GGGGSGGGGSGGGGSHVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVWISGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSY
PYNFYDAWGCGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSST
GAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDE
AIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

SEQ ID NO: 32 es IRDF

	CDRL1	CDRL2	CDRL3
	Kabat		
<i>m8h9, ch8H9</i>	RASQSISDY LH SEQ ID NO: 33	YASQSSIS SEQ ID NO: 35	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 37
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	RASQSISDY LY SEQ ID NO: 34	YASQSSIS SEQ ID NO: 36	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 38
	Chothia		
<i>m8h9, ch8H9</i>	SQSISDY SEQ ID NO: 39	YAS SEQ ID NO: 41	GHSFPL SEQ ID NO: 43
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	SQSISDY SEQ ID NO: 40	YAS SEQ ID NO: 42	GHSFPL SEQ ID NO: 44
	Honegger		
<i>m8h9, ch8H9</i>	ASQSISDY SEQ ID NO: 45	YASQSISGIPSR SEQ ID NO: 47	GHSFPL SEQ ID NO: 49
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	ASQSISDY SEQ ID NO: 46	YASQSISGIPAR SEQ ID NO: 48	GHSFPL SEQ ID NO: 50
	IMGT		
<i>m8h9, ch8H9</i>	QSISDY SEQ ID NO: 51	YAS SEQ ID NO: 53	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 55
<i>3.1, 5.1 de Hu8H9</i>	QSISDY SEQ ID NO: 52	YAS SEQ ID NO: 54	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 56
	CDRH1	CDRH2	CDRH3
	Kabat		
<i>m8h9, ch8H9</i>	NYDIN SEQ ID NO: 57	WIFPGDGSTQYNEKFKG SEQ ID NO: 59	QTTATWFAY SEQ ID NO: 61
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	NYDIN SEQ ID NO: 58	WIFPGDDSTQYNEKFKG SEQ ID NO: 60	QTTGTWFAY SEQ ID NO: 62
	Chothia		
<i>m8h9, ch8H9</i>	GYTFTNY SEQ ID NO: 63	PGDG SEQ ID NO: 65	TTATWFA SEQ ID NO: 67
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	GYTFTNY SEQ ID NO: 64	PGDD SEQ ID NO: 66	TTGTWFA SEQ ID NO: 68
	Honegger		
<i>m8h9, ch8H9</i>	ASGYTFTNYD SEQ ID NO: 69	IFPGDGSTQYNEKFKGKA SEQ ID NO: 71	QTTATWFA SEQ ID NO: 73
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	TSGYTFTNYD SEQ ID NO: 70	IFPGDDSTQYNEKFKGRV SEQ ID NO: 72	QTTGTWFA SEQ ID NO: 74
	IMGT		
<i>m8h9, ch8H9</i>	GYTFTNYD SEQ ID NO: 75	IFPGDGST SEQ ID NO: 77	ARQTTATWFAY SEQ ID NO: 79
<i>3.1, 5.1 de hu8H9</i>	GYTFTNYD SEQ ID NO: 76	IFPGDDST SEQ ID NO: 78	ARQTTGTWFAY SEQ ID NO: 80

SEQ ID NO: 81 es TCAGTTTTGGCCCAGGCGGCC

SEQ ID NO: 82 es ACCACTAGTTGGGCCGGCCTG

SEQ ID NO: 83 es CTTTCGCTGTTTTTCAATATTTTCTGTTATTGCTTCAGTTTTGGCCCAGGCGGCC

5 SEQ ID NO: 84 es GAGCCGCCACCCCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACTAGTTGGGCCGGCCTG

SEQ ID NO: 85 es FVSIRDFG

SEQ ID NO: 86 es IQDF

Definiciones

10 En esta solicitud, a menos que quede claro otra cosa a partir del contexto, (i) el término “un(o)” puede entenderse que significa “al menos un(o)”; (ii) el término “o” puede entenderse que significa “y/o”; (iii) los términos “que comprende” y “que incluye” pueden entenderse que engloban etapas o componentes detallados ya se presenten por sí mismos o junto con uno o más etapas o componentes adicionales; y (iv) los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” pueden entenderse que permiten la variación habitual tal como entenderán los expertos habituales en la técnica; y (v) cuando se proporcionan intervalos, están incluidos los extremos.

Administración: Tal como se usa en el presente documento, el término “administración” se refiere a la administración de una composición a un sujeto o sistema. La administración a un sujeto animal (por ejemplo, a un ser humano) puede ser mediante cualquier vía apropiada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración puede ser bronquial (incluyendo mediante instilación bronquial), bucal, enteral, interdérmica, intraarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, mucosa, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (incluyendo mediante instilación intratraqueal), transdérmica, vaginal y vítea. En algunas realizaciones, administración puede implicar dosificación intermitente. En algunas realizaciones, administración puede implicar dosificación continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un periodo de tiempo seleccionado.

Afinidad: Tal como se conoce en la técnica, “afinidad” es una medida de la firmeza con que un ligando particular se une a su pareja. Pueden medirse afinidades de diferentes maneras. En algunas realizaciones, se mide la afinidad mediante un ensayo cuantitativo. En algunas de tales realizaciones, la concentración de pareja de unión puede fijarse para que sea superior a la concentración de ligando de modo que se imiten las condiciones fisiológicas. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, la concentración de pareja de unión y/o la concentración de ligando pueden variarse. En algunas de tales realizaciones, la afinidad puede compararse con una referencia en condiciones (por ejemplo, concentraciones) comparables.

Agente: El término “agente” tal como se usa en el presente documento puede referirse a un compuesto o una entidad de cualquier clase química incluyendo, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, moléculas pequeñas, metales, o combinaciones de los mismos. Tal como quedará claro a partir del contexto, en algunas realizaciones, un agente puede ser o comprender una célula o un organismo, o una fracción, un extracto o componente de los mismos. En algunas realizaciones, un agente es o comprende un producto natural en el sentido de que se encuentra en y/o se obtiene de la naturaleza. En algunas realizaciones, un agente es o comprende una o más entidades que están fabricadas por el hombre en el sentido de que se diseñan, modifican por ingeniería y/o producen a través de la acción de la mano del hombre y/o no se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, un agente puede utilizarse en forma aislada o pura; en algunas realizaciones, un agente puede utilizarse en una forma en bruto. En algunas realizaciones, se proporcionan posibles agentes como colecciones o bibliotecas, por ejemplo, que pueden examinarse para identificar o caracterizar agentes activos dentro de las mismas. Algunas realizaciones particulares de agentes que pueden utilizarse según la presente invención incluyen moléculas pequeñas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, aptámeros, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNip, ARNhp, híbridos de ADN/ARN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas), péptidos, peptidomiméticos. En algunas realizaciones, un agente es o comprende un polímero. En algunas realizaciones, un agente no es un polímero y/o está sustancialmente libre de cualquier polímero. En algunas realizaciones, un agente contiene al menos un resto polimérico. En algunas realizaciones, un agente carece de o está sustancialmente libre de cualquier resto polimérico.

Aminoácido: Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido”, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena de polipéptido. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general $H_2NC(H)(R)-COOH$. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido que se produce de manera natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un d-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un l-aminoácido. “Aminoácido convencional” se refiere a cualquiera de los veinte l-aminoácidos convencionales que se encuentran habitualmente en péptidos que se producen de manera natural. “Aminoácido no convencional” se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos convencionales, independientemente de si se prepara de manera sintética o se obtiene de una fuente natural. Tal como se usa en el presente documento, “aminoácido sintético” engloba aminoácidos modificados químicamente, incluyendo sales, derivados (tales como amidas), y/o sustituciones de aminoácidos. Los aminoácidos, incluyendo aminoácidos carboxi y/o amino-terminales en péptidos, pueden modificarse mediante metilación, amidación, acetilación, grupos protectores, y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida circulante del péptido sin afectar adversamente a su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. Los aminoácidos pueden comprender una o modificaciones postraduccionales, tales como asociación con una o más entidades químicas (por ejemplo, grupos metilo, grupos acetato, grupos acetilo, grupos fosfato, restos formilo, grupos isoprenoides, grupos sulfato, restos de polietilenglicol, restos de lípido, restos de hidrato de carbono, restos de biotina). El término “aminoácido” se usa indistintamente con “residuo de aminoácido”, y puede referirse a un libre aminoácido y/o a un residuo de aminoácido de un péptido. Resultará evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o un residuo de un péptido.

Análogo: Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo” se refiere a una sustancia que comparte uno o más características estructurales, elementos, componentes o restos particulares con una sustancia de referencia. Normalmente, un “análogo” muestra similitud estructural significativa con la sustancia de referencia, por ejemplo, compartiendo una estructura central o de consenso, pero también difiere de determinadas maneras discretas. En algunas realizaciones, un análogo es una sustancia que puede generarse a partir de la sustancia de referencia mediante manipulación química de la sustancia de referencia. En algunas realizaciones, un análogo es una sustancia que puede generarse a través de la realización de un procedimiento de síntesis sustancialmente similar a (por ejemplo, compartiendo una pluralidad de etapas con) uno que genera la sustancia de referencia. En algunas realizaciones, un análogo es o puede generarse a través de la realización de un procedimiento de síntesis diferente del usado para generar la sustancia de referencia.

Animal: Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, “animal” se refiere a seres humanos, en cualquier fase de desarrollo. En algunas realizaciones, “animal” se refiere a animales no humanos, en cualquier fase de desarrollo. En algunas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, animal modificado por ingeniería genética, y/o un clon.

Antagonista: Tal como se usa en el presente documento, el término “antagonista” se refiere a un agente que i) inhibe, disminuye o reduce los efectos de otro agente; y/o ii) inhibe, disminuye, reduce o retarda uno o más eventos biológicos. Los antagonistas pueden ser o incluyen agentes de cualquier clase química incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, metales, y/o cualquier otra entidad que muestra la actividad inhibidora relevante. Un antagonista puede ser directo (en cuyo caso ejerce su influencia directamente sobre su diana) o indirecto (en cuyo caso ejerce su influencia de un modo distinto a la unión a su diana; por ejemplo, mediante interacción con un regulador de la diana, por ejemplo, de modo que se altera al nivel o la actividad de la diana).

Anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido que incluye elementos de secuencia de inmunoglobulina canónicos suficientes para conferir unión específica a un antígeno diana particular. Tal como se conoce en la técnica, los anticuerpos intactos tal como se producen en la naturaleza son agentes tetraméricos de aproximadamente 150 kD que se componen de dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (aproximadamente de 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos (aproximadamente de 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que se denomina habitualmente estructura “en forma de Y”. Cada cadena pesada se compone de al menos cuatro dominios (cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de largo): un dominio variable (VH) amino-terminal (ubicado en las puntas de la estructura en Y), seguido por tres dominios constantes: CH1, CH2 y el CH3 carboxi-terminal (ubicado en la base del vástago de la Y). Una región corta, conocida como el “interruptor”, conecta las regiones variables y constantes de cadena pesada. La “bisagra” conecta los dominios CH2 y CH3 a la parte restante del anticuerpo. Dos enlaces disulfuro en esta región bisagra conectan los dos polipéptidos de cadena pesada entre sí en un anticuerpo intacto. Cada cadena ligera se compone de dos dominios: un dominio variable (VL) amino-terminal, seguido por un dominio constante (CL) carboxi-terminal, separados uno de otro por otro “interruptor”. Los tetrámeros de anticuerpo intacto se componen de dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera en los que las cadenas pesada y ligera se unen entre sí mediante un único enlace disulfuro; otros dos enlaces disulfuro conectan las regiones bisagra de cadena pesada entre sí, de modo que los dímeros se conectan entre sí y se forma el tetrámero. Los anticuerpos producidos de manera natural también se glicosilan, normalmente en el dominio CH2. Cada dominio en un anticuerpo natural tiene una estructura caracterizada por un “plegamiento de inmunoglobulina” formado a partir de dos láminas beta (por ejemplo, láminas de 3, 4 o 5 cadenas) empaquetadas unas contra otras en un barril beta antiparalelo comprimido. Cada dominio variable contiene tres bucles hipervariables conocidos como “regiones determinantes de complementariedad” (CDR1, CDR2 y CDR3) y cuatro regiones “de marco” algo invariantes (FR1, FR2, FR3 y FR4). Cuando se pliegan los anticuerpos naturales, las regiones FR forman las láminas beta que proporcionan el marco estructural para los dominios, y las regiones de bucle de CDR tanto de cadenas pesadas como ligeras se aproximan en el espacio tridimensional de modo que crean un único sitio de unión a antígeno hipervariable ubicado en la punta de la estructura en Y. Las comparaciones de secuencias de aminoácidos entre cadenas de polipéptido de anticuerpo han definido dos clases de cadena ligera (κ y λ), varias clases de cadena pesada (por ejemplo, μ , γ , α , ε , δ) y determinadas subclases de cadena pesada ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$). Las clases de anticuerpo (IgA [incluyendo IgA1, IgA2], IgD, IgE, IgG [incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4], IgM) se definen basándose en la clase de las secuencias de cadena pesada utilizadas. La región Fc de anticuerpos que se producen de manera natural se une a elementos del sistema del complemento, y también a receptores en células efectoras, incluyendo por ejemplo, células efectoras que median en la citotoxicidad. Tal como se conoce en la técnica, pueden modularse la afinidad y/u otros atributos de unión de regiones Fc para receptores de Fc a través de glicosilación u otra modificación. En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos y/o utilizados según la presente invención incluyen dominios de Fc glicosilados, incluyendo dominios de Fc con tal glicosilación modificados o modificados por ingeniería. A efectos de la presente invención, en determinadas realizaciones, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluye suficientes secuencias de dominio de inmunoglobulina tal como se encuentran en anticuerpos naturales puede denominarse y/o usarse como “anticuerpo”, si tal polipéptido se produce de manera natural (por ejemplo, generado por un organismo que reacciona a un antígeno), o producido mediante modificación por ingeniería recombinante, síntesis química, u otro sistema o metodología artificial. En algunas realizaciones, un anticuerpo es policlonal; en algunas realizaciones, un anticuerpo es monoclonal. En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene secuencias de región constante que son características de anticuerpos de ratón, conejo, primate o humanos. En algunas realizaciones, elementos de secuencia de anticuerpo se humanizan, primatizan, son quiméricos, tal como se conoce en la técnica. Además, el término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia en realizaciones apropiadas (a menos que se establezca de otro modo o quede claro a partir del contexto) a cualquiera de los formatos o constructos conocidos en la técnica o desarrollados para captar características estructurales y funcionales de anticuerpos en una presentación alternativa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término puede referirse a anticuerpos biespecíficos u otros multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos de tipo Zybody), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (*small modular immunopharmaceuticals* “SMIPsTM”),

anticuerpos de cadena sencilla (Accs), anticuerpos cameloides, y/o fragmentos de anticuerpo. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede carecer de una modificación covalente (por ejemplo, unión de un glicano) que tendría si se produjera de manera natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede contener una modificación covalente (por ejemplo, unión de un glicano, una carga útil [por ejemplo, un resto detectable, un resto terapéutico, un resto catalítico]), u otro grupo colgante (por ejemplo, poli-etilenglicol).

Agente de anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de anticuerpo” se refiere a un agente que específicamente se une a un antígeno particular. En algunas realizaciones, el término engloba cualquier polipéptido con elementos estructurales de inmunoglobulina suficientes para conferir unión específica. Los agentes de anticuerpo adecuados incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados a otras proteínas, radiomarcadores, citotoxinas), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (“SMIPsTM”), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos cameloides, y fragmentos de anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de anticuerpo” también incluye anticuerpos intactos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos del mismo)), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada. En algunas realizaciones, el término engloba péptidos grapados. En algunas realizaciones, el término engloba uno o más peptidomiméticos de unión similares a anticuerpos. En algunas realizaciones, el término engloba una o más proteínas de andamiaje de unión similares a anticuerpos. En algunas realizaciones, el término engloba monocuerpos o adnectinas. En muchas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye uno o más elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como región determinante de complementariedad (CDR); en algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una CDR (por ejemplo, al menos una CDR de cadena pesada y/o al menos una CDR de cadena ligera) que es sustancialmente idéntica a la que se encuentra en un anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque o bien es idéntica en secuencia o bien contiene entre 1-5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque muestra una identidad de secuencia de al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% con la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque muestra una identidad de secuencia de al menos el 96%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% con la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque se deleciona, añade o sustituye al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo demás a la de la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque se delecionan, añaden o sustituyen 1-5 aminoácidos dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo demás a la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque se sustituye al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo demás a la de la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque se delecionan, añaden o sustituyen 1-5 aminoácidos dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo demás a la CDR de referencia. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como dominio variable de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es una proteína de polipéptido que tiene un dominio de unión que es homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. El término agente de anticuerpo incluye receptores de antígeno quiméricos.

Fragmento de anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, un “fragmento de anticuerpo” incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión a antígeno o variable de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados, “fragmentos Fv”, que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptido de cadena sencilla recombinantes en los que las regiones variables de cadena ligera y pesada se conectan mediante un ligador peptídico (“proteínas ScFv”), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácido que imitan la región hipervariable. En muchas realizaciones, un fragmento de anticuerpo contiene suficiente secuencia del anticuerpo parental del que es un fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental; en algunas realizaciones, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo parental y/o compite con el anticuerpo parental por la unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento scFv, fragmento Fv, diacuerpo dsFv, fragmento dAb, fragmento Fd', fragmento Fd, y una región aislada de región determinante de complementariedad (CDR). Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede producirse mediante cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede producirse de manera

enzimática o química mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse de manera recombinante a partir de un gen que codifica para la secuencia parcial de anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede producirse de manera sintética total o parcialmente. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de

cadena sencilla. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que se unen entre sí, por ejemplo, mediante uniones disulfuro. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional comprende normalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y comprende más normalmente al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

Polipéptido de anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido de anticuerpo” o “anticuerpo”, o “fragmento de unión a antígeno del mismo, que pueden usarse indistintamente, se refieren a polipéptido(s) que puede(n) unirse a un epítipo. En algunas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, y en algunas realizaciones, es menor a la longitud completa pero incluye al menos un sitio de unión (que comprende al menos una, y preferiblemente al menos dos secuencias con estructura de “regiones variables” de anticuerpo). En algunas realizaciones, el término “polipéptido de anticuerpo” engloba cualquier proteína que tiene un dominio de unión, que es homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. En realizaciones particulares, “polipéptidos de anticuerpo” engloba polipéptidos que tienen un dominio de unión que muestra una identidad de al menos el 99% con un dominio de unión de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, “polipéptido de anticuerpo” es cualquier proteína que tiene un dominio de unión que muestra una identidad de al menos el 70%, 80%, 85%, 90% o el 95% con un dominio de unión de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio de unión de inmunoglobulina de referencia. Un “polipéptido de anticuerpo” incluido puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un anticuerpo que se encuentra en una fuente natural. Pueden prepararse polipéptidos de anticuerpo según la presente invención mediante cualquier medio disponible incluyendo, por ejemplo, aislamiento de una fuente natural o biblioteca de anticuerpos, producción recombinante en o con un sistema del huésped, síntesis química, o combinaciones de los mismos. Un polipéptido de anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un polipéptido de anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede ser un miembro de la clase de inmunoglobulina IgG. Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido de anticuerpo” o “porción característica de un anticuerpo” se usan indistintamente y se refieren a cualquiera derivado de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a un epítipo de interés. En determinadas realizaciones, el “polipéptido de anticuerpo” es un fragmento de anticuerpo que conserva al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo dsFv y Fd. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que se unen entre sí, por ejemplo, mediante uniones disulfuro. En algunas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los polipéptidos de anticuerpo pueden ser uno humanizado. Los polipéptidos de anticuerpo humanizado incluidos pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o polipéptidos de anticuerpo (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humano. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Antígeno: Un “antígeno” es una molécula o entidad que i) provoca una respuesta inmunitaria; y/o (ii) se une específicamente mediante un receptor de células T (por ejemplo, cuando se presenta mediante una molécula de CMH) o un anticuerpo (por ejemplo, producido por una célula B), por ejemplo, cuando se expone o administra a un organismo. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta humoral (por ejemplo, incluyendo la producción de anticuerpos específicos de antígeno) en un organismo; alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta celular (por ejemplo, que implica células T cuyos receptores interaccionan específicamente con el antígeno) en un organismo. Los expertos en la técnica apreciarán que un antígeno particular puede provocar una respuesta inmunitaria en uno o varios miembros de un organismo diana (por ejemplo, ratones, conejos, primates, seres humanos), pero no en todos los miembros de la especie de organismo de diana. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta inmunitaria en al menos aproximadamente el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, el 99% de los miembros de una especie de organismo diana. En algunas realizaciones, un antígeno se une a un anticuerpo y/o receptor de células T, y puede inducir o no una respuesta fisiológica particular en un organismo. En algunas realizaciones, por ejemplo, un antígeno puede unirse a un anticuerpo y/o a un receptor de células T *in vitro*, se produzca o no tal interacción *in vivo*. En general, un antígeno puede ser o incluir cualquier entidad química tal como, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, un hidrato de carbono, un lípido, un polímero [en algunas realizaciones distinto de un polímero biológico (por ejemplo, distinto de un polímero de ácido nucleico o aminoácidos)]. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un polipéptido. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un glicano. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, en general, un antígeno puede proporcionarse o utilizarse en forma aislada o pura, o alternativamente puede proporcionarse en una forma en bruto (por ejemplo, junto con otros materiales, por ejemplo,

en un extracto tal como un extracto celular u otra preparación relativamente en bruto de una fuente que contiene antígeno). En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un antígeno recombinante. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un polipéptido o una porción del mismo. En algunas realizaciones, un antígeno se asocia con (por ejemplo, se expresa por) un agente infeccioso. En algunas realizaciones, un antígeno se asocia con cáncer (por ejemplo, con células tumorales y/o metástasis).

Fragmento de unión a antígeno: El término “fragmento de unión a antígeno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, por ejemplo, CDR3 de VH que comprende o no secuencia adicional (ligador, región/regiones de marco) y (vii) una combinación de dos a seis CDR aisladas que comprenden o no secuencia adicional (ligador, región/regiones de marco). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinante, mediante un ligador sintético que permite que formen una única cadena de polipéptido en la que el par de regiones de VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también pretenden estar englobados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una región variable de cadena pesada fusionada a una región variable de cadena ligera a través de un péptido ligador) que se fusiona a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. La región bisagra puede modificarse mediante el reemplazo de uno o más residuos de cisteína por residuos de serina para impedir la dimerización. Tales proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se dan a conocer además en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales que conocen los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos variables de cadena sencilla divalentes (o bivalentes) (di-scFv, bi-scFv) o, alternativamente, denominados diacuerpos que pueden modificarse por ingeniería mediante medios de biología molecular convencionales.

Célula presentadora de antígeno: La expresión “célula presentadora de antígeno” o “APC”, tal como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica con referencia a células que procesan y presentan antígenos a células T. Las células de antígeno a modo de ejemplo incluyen células dendríticas, macrófagos y determinadas células epiteliales activadas.

Identidad antigénica: tal como se usa en el presente documento, el término “identidad antigénica” (IA) se refiere la fracción en porcentaje de aminoácidos en un polipéptido de interés, o porción del mismo [por ejemplo, en un polipéptido de HA, o en un epítipo (por ejemplo, un epítipo inmunodominante) del mismo], que se comparten con un polipéptido de referencia relevante (por ejemplo, un polipéptido de HA parental que puede ser, por ejemplo, un HA pandémico), o porción del mismo. El valor de IA que resulta de la comparación de dos polipéptidos o secuencias cualquiera puede ser un número entre 0 y 100, indicando un valor de 100 que los dos polipéptidos, o porciones de los mismos, son idénticos en secuencia.

Aproximadamente: Tal como se usa en el presente documento, los términos “aproximadamente” y “de manera aproximada” pretenden englobar cada uno una variación estadística normal tal como entenderán los expertos habituales en la técnica según sea apropiado para el contexto relevante. En determinadas realizaciones, los términos “aproximadamente” o “de manera aproximada” se refieren cada uno a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, el 1%, o menos en cualquier dirección (mayor de o menor de) de un valor establecido, a menos que se establezca de otro modo o resulte evidente de otro modo a partir del contexto (por ejemplo, cuando tal número superaría el 100% de un valor posible).

Asociado con: Dos eventos o entidades se “asocian” entre sí, tal como se usa ese término en el presente documento, si la presencia, el nivel y/o la forma de uno se correlaciona con el del otro. Por ejemplo, una entidad particular (por ejemplo, polipéptido) se considera que está asociado con una enfermedad, un trastorno o estado particular, si su presencia, nivel y/o forma se correlaciona con la incidencia de y/o propensión a la enfermedad, el trastorno o estado (por ejemplo, a través de una población relevante). En algunas realizaciones, dos o más entidades se “asocian” físicamente entre sí si interaccionan, directa o indirectamente, de modo que están y permanecen en proximidad física entre sí. En algunas realizaciones, dos o más entidades que se asocian físicamente entre sí se unen de manera covalente entre sí; en algunas realizaciones, dos o más entidades que se

asocian físicamente entre sí no se unen de manera covalente entre sí sino que se asocian de manera no covalente, por ejemplo, por medio de enlaces de hidrógeno, interacción de van der Waals, interacciones hidrófobas, magnetismo, y combinaciones de los mismos.

Biológicamente activo: Tal como se usa en el presente documento, la expresión “biólogicamente activo” se refiere a una sustancia que tiene actividad en un sistema biológico (por ejemplo, en una célula (por ejemplo, aislada, en cultivo, en un tejido, en un organismo), en un cultivo celular, en un tejido, en un organismo). Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activa. Los expertos en la técnica apreciarán que a menudo sólo una porción o un fragmento de una sustancia biológicamente activa se requiere (por ejemplo, es necesario y suficiente) para que esté presente la actividad; en tales circunstancias, esa porción o ese fragmento se considera que es una porción o un fragmento “biólogicamente activo”.

Unión: Se entenderá que el término “unión”, tal como se usa en el presente documento, normalmente se refiere a una asociación no covalente entre dos o más entidades. Unión “directa” implica contacto físico entre entidades o restos; unión indirecta implica interacción física por medio de contacto físico con una o más entidades intermedias. La unión entre dos o más entidades puede valorarse normalmente en cualquiera de una variedad de contextos, incluyendo cuando interaccionan entidades o restos se estudian en aislamiento o en el contexto de sistemas más complejos (por ejemplo, mientras se unen de manera covalente o se asocian de otro modo con una entidad portadora y/o en una célula o sistema biológico).

Agente de unión: En general, el término “agente de unión” se usa en el presente documento para referirse a cualquier entidad que se une a una diana de interés tal como se describe en el presente documento. En muchas realizaciones, un agente de unión de interés es uno que se une específicamente con su diana porque discrimina su diana de otras posibles parejas de unión en un contexto de interacción particular. En general, un agente de unión puede ser o comprender una entidad de cualquier clase química (por ejemplo, polímero, no polímero, molécula pequeña, polipéptido, hidrato de carbono, lípido, ácido nucleico). En algunas realizaciones, un agente de unión es una única entidad química. En algunas realizaciones, un agente de unión es un complejo de dos o más entidades químicas discretas asociadas entre sí en condiciones relevantes mediante interacciones no covalentes. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que en algunas realizaciones, un agente de unión puede comprender un resto de unión “genérico” (por ejemplo, uno de biotina/avidina/estreptavidina y/o un anticuerpo específico de clase) y un resto de unión “específico” (por ejemplo, un anticuerpo o aptámeros con una diana molecular particular) que se une a la pareja del resto de unión genérico. En algunas realizaciones, tal enfoque puede permitir el ensamblaje modular de múltiples agentes de unión a través de la unión de diferentes restos de unión específica con la misma pareja del resto de unión genérico. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo). En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son aptámeros. En algunas realizaciones, los agentes de unión son polímeros; en algunas realizaciones, los agentes de unión no son polímeros. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden hidratos de carbono. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden lectinas. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden peptidomiméticos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden proteínas de andamiaje. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden mimeótopos. En algunas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden péptidos grapados. En determinadas realizaciones, los agentes de unión son o comprenden ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN.

Porción característica: Tal como se usa en el presente documento, el término “porción característica” se usa, en el sentido más amplio, para referirse a una porción de una sustancia cuya presencia (o ausencia) se correlaciona con presencia (o ausencia) de una característica, un atributo o una actividad particular de la sustancia. En algunas realizaciones, una porción característica de una sustancia es una porción que se encuentra en la sustancia y en sustancias relacionadas que comparten la característica, el atributo o la actividad particular, pero no en aquellas que no comparten la característica, el atributo o la actividad particular. En determinadas realizaciones, una porción característica comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una “porción característica” de una proteína o un polipéptido es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que juntos son característicos de una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones, cada uno de tales tramos continuos contiene generalmente al menos 2, 5, 10, 15, 20, 50, o más aminoácidos. En general, una porción característica de una sustancia (por ejemplo, de una proteína, un anticuerpo) es una que, además de la secuencia y/o identidad estructural especificadas anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta relevante. En algunas realizaciones, una porción característica puede ser biológicamente activa.

Secuencia característica: una “secuencia característica” es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos y, por tanto, puede usarse por los expertos habituales en la técnica para definir miembros de la familia.

Elemento de secuencia característica: Tal como se usa en el presente documento, la expresión “elemento de

secuencia característica” se refiere a un elemento de secuencia que se encuentra en un polímero (por ejemplo, en un polipéptido o ácido nucleico) que representa una porción característica de ese polímero. En algunas realizaciones, presencia de un elemento de secuencia característica se correlaciona con la presencia o el nivel de una actividad o propiedad particular del polímero. En algunas realizaciones, la presencia (o ausencia) de un elemento de secuencia característica define un polímero particular como un miembro (o no un miembro) de una familia particular o grupo de tales polímeros. Un elemento de secuencia característica comprende normalmente al menos dos monómeros (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característica incluye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más monómeros (por ejemplo, monómeros unidos de manera contigua). En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característica incluye al menos tramos primero y segundo de monómeros contiguos separados por una o más regiones espaciadoras cuya longitud puede variar o no a través de polímeros que comparten el elemento de secuencia.

Receptores de antígeno quiméricos/terapia celular adoptiva: Pueden usarse agentes de anticuerpo de la presente invención, incluyendo fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), para la preparación de receptores de antígeno quiméricos, cuya preparación y uso se conocen generalmente en la técnica. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es normalmente una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene un dominio de unión a antígeno de un scFv, u otro agente de anticuerpo, unido a dominios de señalización de células T. Las características de los CAR incluyen su capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por el CMH, aprovechando las propiedades de unión a antígeno de anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígeno no restringido por el CMH proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer antígeno independientemente del procesamiento de antígeno, evitando por tanto un mecanismo principal de escape tumoral. Pueden usarse receptores de antígeno quiméricos para tratamiento terapéutico, incluyendo, por ejemplo, para terapia celular adoptiva. La terapia celular adoptiva es un enfoque terapéutico que incluye normalmente el aislamiento y la expansión y/o manipulación *ex vivo* de células inmunitarias, con frecuencia células T, y la posterior administración de estas células a pacientes, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer. Las células administradas pueden ser autólogas o alogénicas. Pueden manipularse células para expresar receptores de antígeno quiméricos de una cualquiera de las maneras conocidas, incluyendo, por ejemplo, usando transfección de ARN y ADN, ambas de estas tecnologías se conocen en la técnica.

Terapia de combinación: El término “terapia de combinación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas situaciones en las que dos o más agentes farmacéuticos o terapéuticos diferentes se administran en regímenes solapantes o secuenciales de modo que el sujeto se expone simultánea o secuencialmente a ambos agentes. Por “en combinación con”, no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o formularse para administrarse juntos, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la invención. Las composiciones de la invención pueden administrarse simultáneamente a, antes de o posteriormente a, uno o más de otros productos terapéuticos o procedimientos médicos deseados. Se apreciará que los agentes terapéuticamente activos usados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en composiciones diferentes. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un calendario de tiempo determinado para ese agente.

Comparable: El término “comparable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares como para permitir la comparación entre los mismos de modo que pueden extraerse conclusiones de manera razonable basándose en diferencias o similitudes observadas. En algunas realizaciones, los conjuntos de condiciones, circunstancias, individuos o poblaciones comparables están caracterizados por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y una o un pequeño número de características variadas. Los expertos habituales en la técnica entenderán, en el contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para que dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones se consideren comparables. Por ejemplo, los expertos habituales en la técnica apreciarán que conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones son comparables entre sí cuando están caracterizados por un número y tipo suficientes de características sustancialmente idénticas como para justificar una conclusión razonable de que diferencias en los resultados obtenidos o fenómenos observados en o con diferentes conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones están provocadas por, o son indicativas de, la variación en esas características que se varían.

Correspondiente a: Tal como se usa en el presente documento, el término “correspondiente a” se usa con frecuencia para designar un resto o elemento estructural en un agente de interés que comparte una posición (por ejemplo, en el espacio tridimensional o con respecto a otro elemento o resto) con uno presente en un agente de referencia apropiado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término se usa para referirse a la posición/identidad de un residuo en un polímero, tal como un residuo de aminoácido en un polipéptido o un residuo de nucleótido en un ácido nucleico. Los expertos habituales apreciarán que, con fines de simplicidad, los residuos en un polímero de este tipo se designan con frecuencia usando un sistema de numeración canónico basado en un polímero relacionado de referencia, de modo que un residuo en un primer polímero “correspondiente a” un residuo en la posición 190 en el polímero de referencia, por ejemplo, no necesita ser realmente el polímero 190 en el primer polímero sino que más bien corresponde al residuo encontrado en la posición 190 en el polímero de referencia; los expertos habituales en la técnica apreciarán fácilmente cómo identificar aminoácidos “correspondientes”, incluyendo mediante el uso de uno o más algoritmos comercialmente disponibles específicamente diseñados para comparaciones de secuencias de

polímeros.

Derivado: Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado” se refiere a un análogo estructural de una sustancia de referencia. Es decir, un “derivado” es una sustancia que muestra similitud estructural significativa con la sustancia de referencia, por ejemplo, compartiendo una estructura central o de consenso, pero también difiere de determinadas maneras discretas. En algunas realizaciones, un derivado es una sustancia que puede generarse a partir de la sustancia de referencia mediante manipulación química. En algunas realizaciones, un derivado es una sustancia que puede generarse mediante la realización de un procedimiento de síntesis sustancialmente similar a (por ejemplo, que comparte una pluralidad de etapas con) uno que genera la sustancia de referencia.

Entidad/agente de detección: El término “entidad de detección” o “agente de detección” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier elemento, molécula, grupo funcional, compuesto, fragmento o resto que es detectable. En algunas realizaciones, una entidad de detección se proporciona o se usa sola. En algunas realizaciones, una entidad de detección se proporciona y/o se usa en asociación con (por ejemplo, unida a) otro agente. Los ejemplos de entidades de detección incluyen: diversos ligandos, radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{135}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{64}Cu , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , ^{89}Zr), colorantes fluorescentes (para colorantes fluorescentes a modo de ejemplo específicos, véase a continuación), agentes quimioluminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares), agentes bioluminiscentes, nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos que pueden resolverse espectralmente (es decir, puntos cuánticos), nanopartículas de metales (por ejemplo, oro, plata, cobre, platino), nanoagrupaciones, iones de metales paramagnéticos, enzimas (para ejemplos específicos de enzimas, véase a continuación), marcadores colorimétricos (tal como, por ejemplo, colorantes, oro coloidal y similares), biotina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Determinar: Muchas metodologías descritas en el presente documento incluyen una etapa de “determinar”. Los expertos habituales en la técnica, que lean la presente memoria descriptiva, apreciarán que tales “determinaciones” pueden usar o lograrse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas disponibles para los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas específicas a las que se hace referencia explícitamente en el presente documento. En algunas realizaciones, la determinación implica manipulación de una muestra física. En algunas realizaciones, la determinación implica consideración y/o manipulación de datos o información, por ejemplo, usando un ordenador u otra unidad de procesamiento adaptada para realizar un análisis relevante. En algunas realizaciones, la determinación implica recibir información y/o materiales relevantes a partir de una fuente. En algunas realizaciones, la determinación implica comparar una o más características de una muestra o entidad con una referencia comparable.

Forma de dosificación: Tal como se usa en el presente documento, el término “forma de dosificación” se refiere a una unidad físicamente diferenciada de un agente activo (por ejemplo, un agente terapéutico o de diagnóstico) para su administración a un sujeto. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo. En algunas realizaciones, tal cantidad es una cantidad de dosificación unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para su administración según un régimen de dosificación que se ha determinado que se correlaciona con un desenlace deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación terapéutico). Los expertos habituales en la técnica aprecian que la cantidad total de una composición o agente terapéutico administrado a un sujeto particular se determina por uno o más médicos encargados y puede implicar la administración de múltiples formas de dosificación.

Régimen de dosificación: Tal como se usa en el presente documento, el término “régimen de dosificación” se refiere a un conjunto de dosis unitarias (normalmente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, normalmente separadas por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis cada una de las cuales está separada de otra por un periodo de tiempo de la misma duración; en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación tienen la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas realizaciones, diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación tienen cantidades diferentes. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis igual que la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación está correlacionado con un desenlace deseado o beneficioso cuando se administra a lo través de una población relevante (es decir, es un régimen de dosificación terapéutico).

Modificado por ingeniería: En general, el término “modificado por ingeniería” se refiere al aspecto de haberse manipulado de manera artificial. Por ejemplo, se considera que un polinucleótido está “modificado por ingeniería” cuando dos o más secuencias, que no están unidas entre sí en ese orden en la naturaleza, se manipulan de manera artificial para unirse directamente entre sí en el polinucleótido modificado por ingeniería. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, un polinucleótido modificado por ingeniería comprende una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia codificante pero

no en asociación operativa con una segunda secuencia codificante, se une de manera artificial de modo que está operativamente asociada con la segunda secuencia codificante. De manera comparable, se considera que una célula o un organismo está “modificado por ingeniería” si se ha manipulado de modo que se altera su información genética (por ejemplo, se ha introducido nuevo material genético no presente anteriormente, por ejemplo, mediante transformación, apareamiento, hibridación somática, transfección, transducción u otro mecanismo, o se altera o se elimina material genético anteriormente presente, por ejemplo, mediante mutación por sustitución o delección, o mediante protocolos de apareamiento). Tal como resulta habitual en la práctica y se entiende por los expertos en la técnica, la progenie de un polinucleótido o célula modificado por ingeniería todavía se denomina normalmente “modificado por ingeniería” aunque la manipulación real se realizó en una entidad anterior.

Epítipo: Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” tiene su significado tal como se entiende en la técnica. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que un epítipo, también conocido como determinante antigénico, es una región molecular de un antígeno que se reconoce por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, células B o células T. Se apreciará además que los epítipos pueden estar compuestos por azúcares, lípidos o aminoácidos. Los epítipos de antígenos de proteína se dividen en dos categorías, epítipos conformacionales y epítipos lineales, basándose en su estructura e interacción con el parátipo (parte de un anticuerpo que reconoce el epítipo). Un epítipo conformacional está compuesto por secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno y estos epítipos interaccionan con el parátipo basándose en las características de superficie en 3D y la forma o estructura terciaria del antígeno. Los epítipos lineales interaccionan con el parátipo basándose en su estructura primaria y se forma un epítipo lineal por una secuencia de aminoácidos continua a partir del antígeno.

Expresión: Tal como se usa en el presente documento, la “expresión” de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes acontecimientos: (1) producción de un molde de ARN a partir de una secuencia de ADN (por ejemplo, mediante transcripción); (2) procesamiento de un transcrito de ARN (por ejemplo, mediante corte y empalme, edición, formación de caperuza en 5' y/o formación de extremo en 3'); (3) traducción de un ARN para dar un polipéptido o proteína; y/o (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína.

Funcional: Tal como se usa en el presente documento, una molécula biológica “funcional” es una molécula biológica en una forma en la que muestra una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza. Una molécula biológica puede tener dos funciones (es decir, bifuncional) o muchas funciones (es decir, multifuncional).

Fragmento: Un “fragmento” de un material o entidad tal como se describe en el presente documento tiene una estructura que incluye una porción diferenciada del conjunto, pero carece de uno o más restos encontrados en el conjunto. En algunas realizaciones, un fragmento consiste en una porción diferenciada de este tipo. En algunas realizaciones, un fragmento consiste en o comprende un resto o elemento estructural característico encontrado en el conjunto. En algunas realizaciones, un fragmento de polímero comprende o consiste en al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más unidades monoméricas (por ejemplo, residuos) tal como se encuentran en el polímero completo. En algunas realizaciones, un fragmento de polímero comprende o consiste en al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de las unidades monoméricas (por ejemplo, residuos) encontradas en el polímero completo. El material o entidad completo puede denominarse en algunas realizaciones “compuesto parental” del conjunto.

Gen: Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” tiene su significado tal como se entiende en la técnica. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que el término “gen” puede incluir secuencias reguladoras génicas (por ejemplo, promotores, potenciadores) y/o secuencias de intrones. Se apreciará además que las definiciones de gen incluyen referencias a ácidos nucleicos que no codifican para proteínas sino que más bien codifican para moléculas de ARN funcionales tales como ARNt, agentes de inducción de iARN. Con el fin de claridad se observa que, tal como se usa en la presente solicitud, el término “gen” se refiere generalmente a una porción de un ácido nucleico que codifica para una proteína; el término puede englobar opcionalmente secuencias reguladoras, tal como quedará claro a partir del contexto para los expertos habituales en la técnica. No se pretende que esta definición excluya la aplicación del término “gen” a unidades de expresión que no codifican para proteína sino más bien aclarar que, en la mayoría de los casos, el término tal como se usa en este documento se refiere a un ácido nucleico que codifica para proteína.

Producto génico o producto de expresión: Tal como se usa en el presente documento, el término “producto génico” o “producto de expresión” se refiere generalmente a un ARN transcrito a partir de gen (antes y/o después del procesamiento) o a un polipéptido (antes y/o después de la modificación) codificado por un ARN transcrito a partir del gen.

Alta afinidad unión: El término “alta afinidad unión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alto grado de firmeza con el que un ligando particular se une a su pareja. Las afinidades pueden medirse mediante cualquier método disponible, incluyendo los conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se considera que la unión es de alta afinidad si la K_d es de aproximadamente 500 pM o menos (por ejemplo, por debajo de aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 100 pM,

aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 4 pM, aproximadamente 3 pM, aproximadamente 2 pM) en ensayos de unión. En algunas realizaciones, se considera que la unión es de alta afinidad si la afinidad es más fuerte (por ejemplo, la K_d es inferior) para un polipéptido de interés que para un polipéptido de referencia seleccionado. En algunas realizaciones, se considera que la unión es de alta afinidad si la razón de la K_d para un polipéptido de interés con respecto a la K_d para un polipéptido de referencia seleccionado es de 1:1 o menos (por ejemplo, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0,2:1, 0,1:1, 0,05:1, 0,01:1 o menos). En algunas realizaciones, se considera que la unión es de alta afinidad si la K_d para un polipéptido de interés es de aproximadamente el 100% o menos (por ejemplo, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1% o menos) de la K_d para un polipéptido de referencia seleccionado.

Homología: Tal como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. En algunas realizaciones, se considera que moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son idénticas en al menos el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 99%. En algunas realizaciones, se considera que moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son similares en al menos el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 99% (por ejemplo, que contienen residuos con propiedades químicas relacionadas en posiciones correspondientes). Por ejemplo, tal como conocen bien los expertos habituales en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como similares entre sí como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o como que tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse con frecuencia una sustitución "homóloga". A continuación se resumen clasificaciones de aminoácidos típicas:

Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3,5
Acido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	2,5
Acido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0,4
Histidina	His	H	polar	positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1,6
Serina	Ser	s	polar	neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0,7
Triptófano	Trp	w	no polar	neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4,2

Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Tal como entenderán los expertos en la técnica, hay una variedad de algoritmos disponibles que permiten la comparación de secuencias con el fin de determinar su grado de homología, incluyendo permitiendo huecos de longitud designada en una secuencia con respecto a otra cuando se considera qué residuos "corresponden" a otro en diferentes secuencias. El cálculo de la homología en porcentaje entre dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico para una

alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no correspondientes con fines de comparación). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada con fines de comparación es de al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o sustancialmente el 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por un nucleótido similar a la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son similares en esa posición. La homología en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas y similares compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. Los algoritmos y programas informáticos representativos útiles en la determinación de la homología en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. La homología en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse, alternativamente, por ejemplo, usando el programa GAP en el paquete de software de GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

Ser humano: En algunas realizaciones, un ser humano es un embrión, un feto, un lactante, un niño, un adolescente, un adulto o un anciano.

Hidrófilo: Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrófilo” y/o “polar” se refiere a una tendencia a mezclarse con, o disolverse fácilmente en, agua.

Hidrófobo: Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrófobo” y/o “no polar”, se refiere a una tendencia a repeler, no combinarse con, o una incapacidad para disolverse fácilmente en, agua.

Identidad: Tal como se usa en el presente documento, el término “identidad” se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. En algunas realizaciones, se considera que moléculas poliméricas son “sustancialmente idénticas” entre sí si sus secuencias son idénticas en al menos el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 99%. El cálculo de la identidad en porcentaje de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias para una alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no idénticas con fines de comparación). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada con fines de comparación es de al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o sustancialmente el 100% de la longitud de una secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo (por ejemplo, nucleótido o aminoácido) que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0). En algunas realizaciones a modo de ejemplo, las comparaciones de secuencias de ácido nucleico realizadas con el programa ALIGN usan una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. La identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse, alternativamente, usando el programa GAP en el paquete de software de GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

Aislado: Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que está asociada cuando se produce inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) diseñado, producido, preparado y/o fabricado de manera artificial. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más de aproximadamente el 99% de los otros componentes con los que estaban inicialmente asociadas. En algunas realizaciones, los agentes aislados son puros en aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más de aproximadamente el 99%. Tal como se usa en el presente documento, una sustancia es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas realizaciones, tal como entenderán los expertos en la técnica, una sustancia todavía

puede considerarse “aislada” o incluso “pura”, después de haberse combinado con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua); en tales realizaciones, el aislamiento o la pureza en porcentaje de la sustancia se calcula sin incluir tales portadores o excipientes. En algunas realizaciones, el aislamiento implica o requiere la alteración de enlaces covalentes (por ejemplo, para aislar un dominio de polipéptido a partir de un polipéptido más largo y/o para aislar un elemento de secuencia de nucleótidos a partir de un oligonucleótido o ácido nucleico más largo).

Marcador: Un marcador, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad o resto cuya presencia o nivel es una característica de un estado o acontecimiento particular. En algunas realizaciones, la presencia o el nivel de un marcador particular puede ser característico de la presencia o estadio de una enfermedad, trastorno o estado. Para dar simplemente un ejemplo, en algunas realizaciones, el término se refiere a un producto de expresión génica que es característico de un tumor particular, subclase de tumor, estadio de tumor. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, la presencia o nivel de un marcador particular se correlaciona con la actividad (o nivel de actividad) de una ruta de señalización particular, por ejemplo, que puede ser característica de una clase particular de tumores. La significación estadística de la presencia o ausencia de un marcador puede variar dependiendo del marcador particular. En algunas realizaciones, la detección de un marcador es altamente específica ya que refleja una alta probabilidad de que el tumor sea de una subclase particular. Tal especificidad puede producirse a costa de la sensibilidad (es decir, puede producirse un resultado negativo aunque el tumor sea un tumor que se esperaría que exprese el marcador). A la inversa, los marcadores con un alto grado de sensibilidad pueden ser menos específicos que aquellos con una sensibilidad inferior. Según la presente invención, un marcador útil no necesita distinguir tumores de una subclase particular con una precisión del 100%.

Mutante: Tal como se usa en el presente documento, el término “mutante” se refiere a una entidad que muestra identidad estructural significativa con una entidad de referencia pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en cuanto a la presencia o nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. En muchas realizaciones, un mutante también difiere funcionalmente de su entidad de referencia. En general, considerar apropiadamente si una entidad particular es un “mutante” de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene ciertos elementos estructurales característicos. Un mutante, por definición, es una entidad química distinta que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para dar simplemente algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural de núcleo característico (por ejemplo, un núcleo de macrociclo) y/o uno o más restos colgantes característicos de modo que un mutante de la molécula pequeña es uno que comparte el elemento estructural de núcleo y los restos colgantes característicos pero difiere en otros restos colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (sencillos frente a dobles, E frente a Z) dentro del núcleo, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característica compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas unos con respecto a otros en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característica compuesto por una pluralidad de residuos de nucleótido que tienen posiciones designadas unos con respecto a otros en el espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, un polipéptido mutante puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en los restos químicos (por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos) unidos de manera covalente a la estructura principal de polipéptido. En algunas realizaciones, un polipéptido mutante muestra una identidad de secuencia global con un polipéptido de referencia que es de al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o el 99%. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un polipéptido mutante no comparte al menos un elemento de secuencia característica con un polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, el polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunas realizaciones, un polipéptido mutante comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido mutante carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido mutante muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia.

Ácido nucleico: Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico”, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido a través de una unión fosfodiéster. Tal como quedará claro a partir del contexto, en algunas realizaciones, “ácido nucleico” se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas realizaciones, “ácido nucleico” se refiere a una cadena de oligonucleótido que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, un “ácido nucleico” es o comprende ARN; en algunas realizaciones, un “ácido nucleico” es o comprende ADN. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en que no usa una estructura principal de fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más “ácidos nucleicos peptídicos”, que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la estructura principal, que se considera que están dentro del alcance de la presente invención. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un ácido nucleico tiene una o más uniones fosforotioato y/o

5'-N-fosforamidita en vez de enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas realizaciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de nucleósido (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5-propinil-citidina, C-5-propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y combinaciones de los mismos). En algunas realizaciones, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxiribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con los de ácidos nucleicos naturales. En algunas realizaciones, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico funcional tal como un ARN o proteína. En algunas realizaciones, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas realizaciones, se preparan ácidos nucleicos mediante uno o más de aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática mediante polimerización basándose en un molde complementario (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante y síntesis química. En algunas realizaciones, un ácido nucleico tiene al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud.

Paciente: Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que va a o puede administrarse una composición proporcionada, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o seres humanos). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, en algunas realizaciones, un animal puede ser un animal doméstico (por ejemplo, un animal de granja, un animal de compañía) En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano. En algunas realizaciones, un paciente padece o es propenso a uno o más trastornos o estados. En algunas realizaciones, un paciente presenta uno o más síntomas de un trastorno o estado. En algunas realizaciones, a un paciente se le ha diagnosticado uno o más trastornos o estados. En algunas realizaciones, el trastorno o estado es o incluye cáncer, o presencia de uno o más tumores. En algunas realizaciones, tal cáncer o tumor es o comprende un cáncer de próstata o tumor en la próstata. En algunas realizaciones, el trastorno o estado es cáncer metastásico.

Péptido: El término "péptido" se refiere a dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. En realizaciones particulares, "péptido" se refiere a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, menos de aproximadamente 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos o menos de 10 aminoácidos.

Composición farmacéutica: Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a un agente activo, formulado junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente activo está presente en cantidad de dosis unitaria apropiada para su administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, disoluciones orales (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos a absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural tales como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como crema, pomada, o un parche de liberación controlada o pulverización aplicada a la piel, pulmones o cavidad oral; por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como óvulo vaginal, crema o espuma; por vía sublingual; por vía ocular; por vía transdérmica; o por vía nasal, por vía pulmonar, y a otras superficies mucosas.

Farmacéuticamente aceptable: El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, se refiere a agentes que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y/o animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivo, de manera proporcional con una razón de beneficio/riesgo razonable.

Portador farmacéuticamente aceptable: Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o disolvente que encapsula material, implicado en portar o transportar el compuesto objeto desde un órgano, o porción del cuerpo, hasta otro órgano, o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; maltosa; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de semilla de soja; glicoles, tales como

propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhidridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Polipéptido: El término “polipéptido”, tal como se usa en el presente documento, tiene generalmente su significado reconocido en la técnica de un polímero de al menos tres aminoácidos, unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, el término se usa para referirse a clases funcionales específicas de polipéptidos. Para cada una de tales clases, la presente memoria descriptiva proporciona varios ejemplos de secuencias de aminoácidos de polipéptidos a modo de ejemplo conocidos dentro de la clase; en algunas realizaciones, tales polipéptidos conocidos son polipéptidos de referencia para la clase. En tales realizaciones, el término “polipéptido” se refiere a cualquier miembro de la clase que muestra homología o identidad de secuencia significativa con un polipéptido de referencia relevante. En muchas realizaciones, tal miembro también comparte una actividad significativa con el polipéptido de referencia. Alternativa o adicionalmente, en muchas realizaciones, tal miembro también comparte un elemento de secuencia característica particular con el polipéptido de referencia (y/o con otros polipéptidos dentro de la clase; en algunas realizaciones con todos los polipéptidos dentro de la clase). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un miembro polipéptido muestra un grado global de homología o identidad de secuencia con un polipéptido de referencia que es de al menos aproximadamente el 30-40%, y es con frecuencia mayor de aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más y/o incluye al menos una región (es decir, una región conservada que en algunas realizaciones puede ser o comprender un elemento de secuencia característica) que muestra una identidad de secuencia muy alta, con frecuencia mayor del 90% o incluso el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99%. Una región conservada de este tipo engloba habitualmente al menos 3-4 y con frecuencia hasta 20 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, una región conservada engloba al menos un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos. En algunas realizaciones, un polipéptido útil puede comprender o consistir en un fragmento de un polipéptido parental. En algunas realizaciones, un polipéptido útil puede comprender o consistir en una pluralidad de fragmentos, cada uno de los cuales se encuentra en el mismo polipéptido parental en una disposición espacial diferente unos con respecto a otros de lo se encuentran en el polipéptido de interés (por ejemplo, fragmentos que están directamente unidos en el compuesto parental pueden estar espacialmente separados en el polipéptido de interés o viceversa, y/o los fragmentos pueden estar presentes en un orden diferente en el polipéptido de interés que en el compuesto parental), de modo que el polipéptido de interés es un derivado de su polipéptido parental. En algunas realizaciones, un polipéptido puede comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o ambos. En algunas realizaciones, un polipéptido puede comprender sólo aminoácidos naturales o sólo aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, un polipéptido puede comprender D-aminoácidos, L-aminoácidos o ambos. En algunas realizaciones, un polipéptido puede comprender sólo D-aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido puede comprender sólo L-aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir uno o más grupos colgantes, por ejemplo, que modifican o unidos a una o más cadenas laterales de aminoácido, y/o en el extremo N-terminal del polipéptido, el extremo C-terminal del polipéptido o ambos. En algunas realizaciones, un polipéptido puede ser cíclico. En algunas realizaciones, un polipéptido no es cíclico. En algunas realizaciones, un polipéptido es lineal.

Proteína: Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína” se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir restos distintos de aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos) y/o pueden procesarse o modificarse de otro modo. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que una “proteína” puede ser una cadena de polipéptido completa tal como se produce por una célula (con o sin una secuencia señal) o puede ser una porción característica de la misma. Los expertos habituales apreciarán que una proteína puede incluir algunas veces más de una cadena de polipéptido, por ejemplo, unidas mediante uno o más enlaces disulfuro o asociadas mediante otros medios. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos o ambos y pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones o análogos de aminoácido conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, metilación. En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos. El término “péptido” se usa generalmente para hacer referencia a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, menos de aproximadamente 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, o menos de 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, las proteínas son anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, porciones biológicamente activas de los mismos y/o porciones características de los mismos.

Puro: Tal como se usa en el presente documento, un agente o entidad es “puro” si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de aproximadamente el 90% de un agente o entidad particular se considera normalmente que es una preparación pura. En algunas realizaciones, un agente o entidad es puro en al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%.

Referencia: El término “referencia” se usa con frecuencia en el presente documento para describir un patrón o agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de control con el que se compara un agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas realizaciones, un agente, individuo, población, muestra,

secuencia o valor de referencia se somete a prueba y/o se determina de manera sustancialmente simultánea con la prueba o determinación del agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas realizaciones, un agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia es una referencia histórica, opcionalmente implementada en un medio tangible. Normalmente, tal como entenderán los expertos en la técnica, un agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o caracteriza en condiciones comparables a las usadas para determinar o caracterizar el agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

Respuesta: Tal como se usa en el presente documento, una respuesta al tratamiento puede referirse a cualquier alteración beneficiosa en el estado de un sujeto que se produce como resultado o se correlaciona con el tratamiento. Tal alteración puede incluir estabilización del estado (por ejemplo, prevención de deterioro que habría tenido lugar en ausencia del tratamiento), mejora de los síntomas del estado y/o mejora de las perspectivas de curación del estado. Puede hacer referencia a la respuesta de un sujeto o a la respuesta de un tumor. La respuesta de tumor o sujeto puede medirse según una amplia variedad de criterios, incluyendo criterios clínicos y criterios objetivos. Las técnicas para evaluar la respuesta incluyen exploración clínica, tomografía por emisión de positrones, radiografía de tórax, TAC, IRM, ecografía, endoscopia, laparoscopia, presencia o nivel de marcadores tumorales en una muestra obtenida a partir de un sujeto, citología y/o histología. Muchas de estas técnicas intentan determinar el tamaño de un tumor o determinar de otro modo la carga tumoral total. Se comentan métodos y directrices para evaluar la respuesta al tratamiento en Therasse *et al.*, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors", European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada, J. Natl. Cancer Inst., 2000, 92(3):205-216. Los criterios de respuesta exactos pueden seleccionarse de cualquier manera apropiada, siempre que, cuando se comparen grupos de tumores y/o pacientes, los grupos que van a compararse se evalúen basándose en criterios iguales o comparables para determinar la tasa de respuesta. Un experto habitual en la técnica podrá seleccionar criterios apropiados.

Unión específica: Tal como se usa en el presente documento, los términos "unión específica" o "específico para" o "específico a" se refieren a una interacción (normalmente no covalente) entre una entidad diana (por ejemplo, una proteína o polipéptido diana) y un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo proporcionado). Tal como entenderán los expertos habituales, se considera que una interacción es "específica" si se favorece en presencia de interacciones alternativas. En muchas realizaciones, una interacción depende normalmente de la presencia de una característica estructural particular de la molécula diana tal como un epítipo o determinante antigénico reconocido por la molécula de unión. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo A, la presencia de un polipéptido que contiene el epítipo A o la presencia de A sin marcar libre en una reacción que contiene tanto A marcado libre como el anticuerpo para el mismo, reducirá la cantidad de A marcado que se une al anticuerpo. Debe entenderse que no se necesita que la especificidad sea absoluta. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que numerosos anticuerpos reaccionan de manera cruzada con otros epítopos además de los presentes en la molécula diana. Tal reactividad cruzada puede ser aceptable dependiendo de la aplicación para la que va a usarse el anticuerpo. En realizaciones particulares, un anticuerpo específico para tirosina cinasas receptoras tiene menos del 10% de reactividad cruzada con tirosina cinasa receptora unida a inhibidores de proteasa (por ejemplo, ACT). Un experto habitual en la técnica podrá seleccionar anticuerpos que tienen un grado suficiente de especificidad para funcionar de manera apropiada en cualquier aplicación dada (por ejemplo, para la detección de una molécula diana, para fines terapéuticos). La especificidad puede evaluarse en el contexto de factores adicionales tales como la afinidad de la molécula de unión para la molécula diana frente a la afinidad de la molécula de unión para otras dianas (por ejemplo, competidores). Si una molécula de unión muestra una alta afinidad por una molécula diana que se desea detectar y baja afinidad por moléculas no diana, el anticuerpo será probablemente un reactivo aceptable con fines de inmunodiagnóstico. Una vez establecida la especificidad de una molécula de unión en uno o más contextos, puede emplearse en otros contextos, preferiblemente similares, sin volver a evaluar necesariamente su especificidad.

Especificidad: Tal como se conoce en la técnica, "especificidad" es una medida de la capacidad de un ligando particular para distinguir su pareja de unión a partir de otras parejas de unión posibles.

Sujeto: Por "sujeto" quiere decirse un mamífero (por ejemplo, un ser humano, en algunas realizaciones incluyendo formas humanas prenatales). En algunas realizaciones, un sujeto padece una enfermedad, trastorno o estado relevante. En algunas realizaciones, un sujeto es propenso a una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, un sujeto presenta uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, un sujeto no presenta ningún síntoma o característica de una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, un sujeto es alguien con uno o más rasgos característicos de propensión a o riesgo de una enfermedad, trastorno o estado. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta ante un proveedor médico para diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, un sujeto es un individuo al que se le administra terapia.

Sustancialmente: Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de mostrar un alcance o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto habitual en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos pocas veces, si es que alguna vez, llegan a completarse y/o proceden hasta completarse o lograr o evitar un resultado absoluto. Por tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para captar la posible falta de completitud inherente

de muchos fenómenos biológicos y químicos.

Homología de secuencia sustancial: La expresión "homología sustancial" se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácido nucleico. Tal como apreciarán los expertos habituales en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos serán características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, tal como conocen bien los expertos habituales en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o como que tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse con frecuencia como una sustitución "homóloga". Las clasificaciones de aminoácidos típicas se resumen a continuación:

Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1,8
Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0,4
Histidina	His	H	polar	positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4,2

Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o Isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Tal como se conoce bien en esta técnica, pueden compararse secuencias de aminoácidos o ácido nucleico usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas a modo de ejemplo se describen en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul, *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente proporcionan normalmente una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más de sus residuos correspondientes son homólogos a lo largo de un tramo relevante de residuos. En algunas realizaciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante tiene al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, al menos 325, al menos 350, al menos 375, al menos 400, al menos 425, al menos 450, al menos 475, al menos 500 o más residuos.

Identidad sustancial: La expresión “identidad sustancial” se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácido nucleico. Tal como apreciarán los expertos habituales en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son “sustancialmente idénticas” si contienen residuos idénticos en posiciones correspondientes. Tal como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácido nucleico pueden compararse usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas a modo de ejemplo se describen en Altschul, *et al.*, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, Methods in Enzymology; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis *et al.*, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, *et al.*, (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente proporcionan normalmente una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos a lo largo de un tramo relevante de residuos. En algunas realizaciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

Similitud estructural sustancial: Tal como se usa en el presente documento, el término “similitud estructural sustancial” se refiere a la presencia de características estructurales compartidas tales como presencia y/o identidad de aminoácidos particulares en posiciones particulares (véanse las definiciones de “homología de secuencia compartida” e “identidad de secuencia compartida”). En algunas realizaciones el término “similitud estructural sustancial” se refiere a la presencia y/o identidad de elementos estructurales (por ejemplo: bucles, láminas, hélices, donadores de enlaces de H, aceptores de enlaces de H, patrones de glicosilación, puentes de sal y enlaces disulfuro). En algunas otras realizaciones, el término “similitud estructural sustancial” se refiere a la disposición tridimensional y/u orientación de átomos o restos unos con respecto a otros (por ejemplo: distancia y/o ángulos entre los mismos entre un agente de interés y un agente de referencia).

Agente terapéutico: Tal como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico” se refiere en general a cualquier agente que provoca un efecto farmacológico deseado cuando se administra a un organismo. En algunas realizaciones, se considera que un agente es un agente terapéutico si demuestra un efecto estadísticamente significativo a través de una población apropiada. En algunas realizaciones, la población apropiada puede ser una población de organismos modelo. En algunas realizaciones, una población apropiada puede definirse mediante diversos criterios, tales como un determinado grupo de edad, sexo, trasfondo genético, estados clínicos preexistentes. En algunas realizaciones, un agente terapéutico es una sustancia que puede usarse para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, prevenir, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o estado. En algunas realizaciones, un “agente terapéutico” es un agente que se ha aprobado o se requiere que se apruebe por una agencia gubernamental antes de poder comercializarse para su administración a seres humanos. En algunas realizaciones, un “agente terapéutico” es un agente para el que se requiere una receta médica para su administración a seres humanos.

Régimen terapéutico: Un “régimen terapéutico”, tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un régimen de dosificación cuya administración a través de una población relevante se correlaciona con un desenlace terapéutico deseado o beneficioso.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es propenso a una enfermedad, trastorno y/o estado según un régimen de dosificación terapéutico, para tratar la enfermedad, trastorno y/o estado. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una que reduce la incidencia y/o gravedad de, y/o retrasa la aparición de, uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o estado. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que el término “cantidad terapéuticamente eficaz” no requiere de hecho que se logre un tratamiento satisfactorio en un individuo particular. En vez de eso, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser la cantidad que proporciona una respuesta farmacológica deseada particular en un número de sujetos significativo cuando se administra a pacientes que necesitan tal tratamiento. Se entiende específicamente que, de hecho, sujetos particulares pueden “no responder” a una “cantidad terapéuticamente eficaz”. Para dar simplemente un ejemplo, un sujeto que no responde puede tener una baja biodisponibilidad de tal manera que no puede obtenerse la eficacia clínica. En algunas realizaciones, la referencia a una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una referencia a una cantidad tal como se mide en uno o más tejidos específicos (por ejemplo, un tejido afectado por la enfermedad, trastorno o estado) o líquidos (por ejemplo, sangre, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina). Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, en algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz puede formularse y/o administrarse en una única dosis. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz puede formularse y/o administrarse en una pluralidad de dosis, por ejemplo, como parte de un régimen de dosificación.

Tratamiento: Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” (también “tratar” o “tratando”), en su sentido más amplio, se refiere a cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, composiciones

proporcionadas) que parcial o completamente alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la gravedad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o estado particular. En algunas realizaciones, tal tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o estado relevante y/o de un sujeto que sólo muestra signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o estado. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o estado relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto al que se le ha diagnosticado que padece la enfermedad, trastorno y/o estado relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de propensión que están estadísticamente correlacionados con un riesgo aumentado de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o estado relevante.

Tratamiento mediante expresión in vivo de anticuerpos: Las células linfoides y no linfoides (por ejemplo, mioblastos, células madre mesenquimatosas) pueden modificarse por ingeniería genética *ex vivo* o *in vivo* para secretar IgG de longitud completa (Compte *et al.*, 2013 Biomatter 3; Noel *et al.*, 1997 Hum Gene Ther 8: 1219-1229. IgG gene therapy using recombinant adenovirus carrying the DNA sequences could achieve high serum IgG levels, but durability was limited by virus immunogenicity (Noel *et al.*, 2002 Hum Gene Ther 13:1483-1493; Jooss y Chirmule, 2004 Gene Ther 10:955-963). Los virus adenoasociados (rAAV), y especialmente los serotipos selectivos, son menos inmunogénicos (Xiao *et al.*, 2012 Therapeutic Delivery 3:835-856), y son vectores duraderos demostrados para terapia génica en seres humanos (Nathwani *et al.*, 2011, N. Engl. J. Med. 365:2357-2365; Patel *et al.*, 2014 International Journal of Hematology 99:372-376). Se han notificado pruebas de concepto preclínicas para anticuerpos IgG de longitud completa específicos para VEGFR-2 (DC101) (Fang *et al.*, 2005 Nat. Biotechnol. 23:584-590), VEGF (Watanabe *et al.*, 2009 Hum. Gene Ther. 20:598-610), HER-2 (Ho *et al.*, 2009 Cancer Gene Ther. 16:184-194; Wang *et al.*, 2010 Cancer Gene Ther. 17, 559-570), Met (Vigna *et al.*, 2008 Cancer Res. 68:9176-9183), y VIH (Balazs *et al.*, 2012 Nature 481:81-84). Se han descrito éxitos similares para fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) contra laminina asociada a la angiogénesis (Arafat *et al.*, 2002 Gene Ther 9:256-262; Sanz *et al.*, 2001 Cancer Immunol. Immunother. 50:557-565; Sanz *et al.*, 2003 EMBO J. 22:1508-1517; Sanz *et al.*, 2002 Gene Ther. 9:1049-1053) y sus formas trivalentes y hexavalentes (Sanchez-Arevalo *et al.*, 2006 Int. J. Cancer 119:455-462), o scFv contra VEGF (Afanasyeva *et al.*, 2003 Gene Ther. 10:1850-1859) y sus derivados bivalentes (minicuerpo y scFv-Fc), o inmunotoxina anti-HER2 de scFv (Liu *et al.*, 2009 Cancer Gene Ther. 16:861-872), o diacuerpos biespecíficos para CEA x CD3 (Blanco *et al.*, 2007 J. Immunol. 171:1070-1077; Compte *et al.*, 2007 Cancer Gene Ther. 14:380-388).

Variante: Tal como se usa en el presente documento, el término “variante” se refiere a una entidad que muestra identidad estructural significativa con una entidad de referencia pero estructuralmente difiere de la entidad de referencia en cuanto a la presencia o el nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. En muchas realizaciones, una variante también difiere funcionalmente de su entidad de referencia. En general, considerar apropiadamente si una entidad particular es una “variante” de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una variante, por definición, es una entidad química distinta que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para dar simplemente algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural de núcleo característico (por ejemplo, un núcleo de macrociclo) y/o uno o más restos colgantes característicos de modo que una variante de la molécula pequeña es una que comparte el elemento estructural de núcleo y los restos colgantes característicos pero difiere en otros restos colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (sencillos frente a dobles, E frente a Z) dentro del núcleo, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característica compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas unos con respecto a otros en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característica compuesto por una pluralidad de residuos de nucleótido que tienen posiciones designadas unos con respecto a otros en el espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, un polipéptido variante puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en los restos químicos (por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos) unidos de manera covalente a la estructura principal de polipéptido. En algunas realizaciones, un polipéptido variante muestra una identidad de secuencia global con un polipéptido de referencia que es de al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o el 99%. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un polipéptido variante no comparte al menos un elemento de secuencia característica con un polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, el polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunas realizaciones, un polipéptido variante comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido variante carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido variante muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. En muchas realizaciones, se considera que un polipéptido de interés es una “variante” de un polipéptido parental o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del compuesto parental salvo por un pequeño número de alteraciones de secuencia en posiciones particulares. Normalmente, menos del 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% de los residuos en la variante están sustituidos en comparación con el compuesto parental. En algunas realizaciones, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos sustituidos en comparación con un compuesto parental. Con frecuencia, una variante tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o

1) de residuos funcionales sustituidos (es decir, residuos que participan en una actividad biológica particular). Además, una variante tiene normalmente no más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o deleciones, y con frecuencia no tiene adiciones o deleciones, en comparación con el compuesto parental. Además, cualquier adición o deleción es normalmente de menos de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y habitualmente es de menos de aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 residuos. En algunas realizaciones, el polipéptido parental o de referencia es uno encontrado en la naturaleza. Tal como entenderán los expertos habituales en la técnica, habitualmente puede encontrarse en la naturaleza una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido de agente infeccioso.

Vector: Tal como se usa en el presente documento, “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que está asociada. En alguna realización, los vectores pueden realizar replicación extracromosómica y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes operativamente unidos se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

Silvestre: Tal como se usa en el presente documento, el término “silvestre” tiene su significado entendido en la técnica que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad tal como se encuentran en la naturaleza en un contexto o estado “normal” (en contraposición a mutante, enfermo, alterado). Los expertos habituales en la técnica apreciarán que con frecuencia existen genes y polipéptidos silvestres en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Descripción detallada de determinadas realizaciones

Mitigación de la supresión inmunitaria

La eliminación de rutas reguladoras negativas que inhiben células inmunitarias está ganando rápidamente importancia en el tratamiento de cáncer. Uno de los ejemplos satisfactorios más tempranos de un enfoque terapéutico de este tipo se implementó en la aprobación de marzo de 2001 por la Food and Drug Administration (FDA) de ipilimumab para el tratamiento de melanoma. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal (AcM) que selecciona como diana CTLA-4, un regulador negativo clave encontrado en células T activadas. CTLA-4 se une a miembros de la familia de B7 de moléculas complementarias que se expresan por células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígeno (APC). La unión de CTLA-4 a estas moléculas complementarias inhibe eficazmente la activación y expansión adicionales de células T, bloqueando de ese modo el progreso de una respuesta inmunitaria que implica tales células (Mellman *et al.*, 2011 Nature 480:480-489). Al seleccionar como diana CTLA-4, ipilimumab libera su inhibición, permitiendo la activación y expansión de células T, incluyendo específicamente las que destruyen las células cancerosas.

Otros enfoques que se han perseguido para tratar el cáncer mediante eliminación de la inhibición inmunitaria incluyen seleccionar como diana el correceptor de células T de muerte programada 1 (PD-1) y sus ligandos B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2, que forman parte de una ruta que mantiene un microentorno tumoral inmunosupresor (Topalian *et al.*, 2012 Curr. Opin. Immunol. 24:207-212). En particular, ensayos clínicos en fase I/II que usan anticuerpos anti-PD-1 (Topalian *et al.*, 2012 N. Engl. J. Med. 366:2443-2454) o anti-PD-L1 (Brahmer *et al.*, 2012 N. Engl. J. Med. 366:2455-2465) han demostrado regresión o estabilización tumoral en melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales y cáncer de ovario.

Se han diseñado todavía otros enfoques para eliminar la inhibición inmunitaria dirigida por linfocitos citolíticos naturales (NK). Por ejemplo, los receptores de tipo Ig de linfocitos citolíticos (KIR) humanos son glicoproteínas que se expresan en superficies de linfocitos citolíticos naturales y se unen a subtipos de clase I de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)/antígeno leucocitario humano (HLA) en posibles células diana. Esta interacción de unión inhibe la citotoxicidad de los linfocitos citolíticos naturales. En ensayos clínicos se ha mostrado que anticuerpos monoclonales que seleccionan como diana KIR bloquean tal inhibición, mitigando la supresión de la actividad NK. (Romagne *et al.*, 2009, Blood 114:2667-2677).

De manera similar, los receptores de tipo Ig de leucocitos (LIR, también conocidos como transcritos de tipo Ig, ILT) también se expresan en superficies de linfocitos citolíticos naturales (así como algunos linfocitos T y B y determinados macrófagos, mastocitos y células dendríticas) y también se unen a subtipos de clase I de CMH/HLA, dando como resultado la inhibición de la actividad de células efectoras que expresan LIR. Algunos estudios han notificado la estimulación satisfactoria de la citotoxicidad de células efectoras mediante el bloqueo de interacciones entre LIR y moléculas de clase I de CMH/GLA (Godal *et al.*, 2010, Biol. Blood Marrow Transplant 16:612-621).

Todavía adicionalmente, se ha perseguido una variedad de enfoques que buscan deshacer la supresión inmunitaria asociada a tumor mediante la selección como diana de antígenos asociados a tumor. Por ejemplo, se han estudiado AcM bloqueantes (por ejemplo, anti-CD47) y se ha encontrado que son eficaces en la estimulación de macrófagos para producir la fagocitosis de células tumorales en leucemia/linfoma y en modelos de tumores sólidos, tanto *in vitro*

como *in vivo* (Zhao *et al.*, 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108:18342-18247; Majeti *et al.*, 2009, Cell 138:286-299; Chao *et al.*, 2011, Cancer Res. 71:1374-1384; Chao *et al.*, 2010, Sci. Transl. Med. 2:63ra94; Chao *et al.*, 2010, Cell 142:699-713; Willingham *et al.*, 2012, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109:6662-6667).

Otras dianas de antígenos tumorales de interés particular incluyen el gangliósido GD2, que se expresa altamente en sarcomas y tumores derivados de neuroectodermo, pero tiene expresión restringida en células normales. Se ha mostrado que la selección como diana de GD2 fomenta la activación de linfocitos citotóxicos naturales mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (Tarek *et al.*, 2012, J. Clin. Invest. 122:3260-3270).

B7H3 humano (también conocido como CD276) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de B7/CD28, que proporciona señales coestimuladoras cruciales que regulan la función de células T en el contexto de monitorización tumoral así como enfermedades infecciosas y autoinmunitarias (Wilcox *et al.*, 2012, Eur. J. Haematol. 88:465-475).

B7H3 se expresa ampliamente en muchos tipos de tumores sólidos, incluyendo en cáncer de próstata (Roth *et al.*, 2007, Cancer Res. 67:7893-900; Zang *et al.*, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:19458-19463), carcinoma de células renales, carcinoma de células uroteliales (Crispen *et al.*, 2008, Clin. Cancer Res. 14:5150-157; Boorjian *et al.*, 2008, Clin. Cancer Res. 14:4800-4808), cáncer de ovario (Zang *et al.*, 2010, Mod. Pathol. 23:1104-1112), glioblastoma (Lemke *et al.*, 2012, Clin. Cancer Res. 18:105-117), osteosarcoma (Wang *et al.*, 2013, PLoS One 8:e70689), neuroblastoma (Gregorio *et al.*, 2008, Histopathology 53:73-80), glioma pontino intrínseco difuso (GPID) (Zhou *et al.*, 2013, J. Neurooncol. 111:257-264), mesotelioma (Calabro *et al.*, 2011, J. Cell Physiol. 226:2595-600) y cáncer de páncreas (Yamato *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 101:1709-1716).

B7H3 se identificó inicialmente como proteína transmembrana de tipo I que, de manera similar a todos los demás miembros de la familia de B7, tiene una región extracelular que sólo contiene un dominio de Ig de tipo V y uno de tipo C (esta forma de B7H3 se denominó 2Ig-B7H3) (Chapoval *et al.*, 2001, Nat. Immunol. 2:269-274). Posteriormente, se identificó una segunda forma de B7H3 humano (huB7H3) (denominada 4Ig-B7H3) que contiene una duplicación del dominio de Ig de tipo V y de tipo C en tándem (Steinberger *et al.*, 2004, J. Immunol. 172:2352-2359; Sun *et al.*, 2002, J. Immunol. 168:6294-6297).

Se considera que B7H3 es inhibidor tanto para linfocitos citotóxicos naturales como para células T. La idea de un papel inhibidor de B7H3 está respaldada por informes que indican que las formas tanto 2Ig como 4Ig de B7H3 humano pueden inhibir la proliferación de células T y la producción de citocinas (Steinberger *et al.*, 2004, J. Immunol. 172:2352-2359; Sun *et al.*, 2002, J. Immunol. 168:6294-6297). Estudios en ratones deficientes para B7H3 sugirieron que B7H3 regula por disminución preferiblemente las respuestas inmunitarias mediadas por TH1 (en contraposición a por TH2) (Suh *et al.*, 2003, Nat. Immunol. 4:899-906). Y otras investigaciones mostraron que la forma 4Ig-B7H3 puede inhibir la lisis mediada por NK de células de neuroblastoma mediante interacción con un supuesto receptor inhibidor en la superficie de linfocitos citotóxicos naturales (Castriconi *et al.*, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:12640-12645). En estudios más recientes que implican pacientes con cáncer de próstata, el nivel de expresión de B7H3 en tejido tumoral en el momento de la cirugía estaba fuertemente correlacionado con el grado al que se había metastatizado el tumor, con un riesgo aumentado de recidiva de cáncer clínica y con muerte específica de cáncer (Roth *et al.*, 2007, Cancer Res. 67:7893-7900; Zang *et al.*, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:19458-19463). De manera similar, un alto nivel de expresión de B7H3 en tejido tumoral se correlacionó con una escasa supervivencia de pacientes en carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células uroteliales (Crispen *et al.*, 2008, Clin. Cancer Res. 14:5150-5157; Boorjian *et al.*, 2008, Clin. Cancer Res. 14:4800-4808), cáncer de ovario (Zang *et al.*, 2010, Mod. Pathol. 23:1104-1112), glioblastoma (Lemke *et al.*, 2012, Clin. Cancer Res. 18:105-117), osteosarcoma (Wang *et al.*, 2013, PLoS One 8:e70689), cáncer de páncreas (Yamato *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 101:1709-1716) y neuroblastoma (Gregorio *et al.*, 2008, Histopathology 53:73-80).

Basándose en datos de estructura cristalina para B7H3 murino (muB7H3), se propuso que B7H3 inhibe la proliferación de células T, al menos en parte, a través del bucle FG de su dominio IgV (Vigdorovich *et al.*, 2013, Structure 21:707-717).

Por otro lado, B7H3 también puede tener propiedades estimuladoras de células T, dependiendo de los receptores con los que interacciona (Hofmeyer *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:10277-10278). Por ejemplo, unos pocos informes iniciales indicaron que 2Ig-B7H3 humano fomenta la activación de células T y la producción de IFN- γ mediante la unión a un supuesto receptor en células T activadas (Chapoval *et al.*, 2001, Nat. Immunol. 2:269-274). Además, estudios que usan determinados modelos de tumor murino proporcionaron datos que sugieren que la respuesta antitumoral del sistema inmunitario se potencia mediante la expresión de B7H3 (Sun *et al.*, 2003, Gene Ther. 10:1728-1734). Y estudios en seres humanos sugirieron que la presencia de B7H3 está correlacionada con una supervivencia aumentada en cáncer gástrico (Wu *et al.*, 2006, World J. Gastroenterol. 12:457-459) y de páncreas (Loos *et al.*, 2009, BMC Cancer 9:463).

Se ha mostrado que un anticuerpo murino, conocido como m8H9, que se une a B7H3, selecciona como diana tumores cerebrales, sarcomas y neuroblastomas infantiles y, en menor grado, adenocarcinomas (Modak *et al.*, 2001, Cancer Res. 61:4048-4054; Xu *et al.*, 2009, Cancer Res. 69:6275-6281). Entre los tumores cerebrales primarios, 15

de 17 glioblastomas sometidos a prueba, 3 de 4 gliomas mixtos sometidos a prueba, 4 de 11 oligodendrogliomas sometidos a prueba, 6 de 8 astrocitomas sometidos a prueba, 2 de 2 meningiomas sometidos a prueba, 3 de 3 schwannomas sometidos a prueba, 2 de 2 meduloblastomas sometidos a prueba, 1 de 1 neurofibroma sometido a prueba, 1 de 2 tumores neuronogliales sometidos a prueba, 2 de 3 ependimomas sometidos a prueba y 1 de 1 pineoblastoma sometido a prueba mostraron unión por 8H9. Entre los sarcomas, 21 de 21 tumores de Ewing/neuroectodérmicos primitivos sometidos a prueba, 28 de 29 rhabdomyosarcomas sometidos a prueba, 28 de 29 osteosarcomas sometidos a prueba, 35 de 37 tumores desmoplásicos de células redondas y pequeñas sometidos a prueba, 2 de 3 sarcomas sinoviales sometidos a prueba, 4 de 4 leiomyosarcomas sometidos a prueba, 1 de 1 histiocitoma fibroso maligno y 2 de 2 sarcomas indiferenciados sometidos a prueba presentaron resultados de prueba positivos para la unión a 8H9. Ochenta y siete de 90 neuroblastomas sometidos a prueba, 12 de 16 melanomas sometidos a prueba, 3 de 4 hepatoblastomas sometidos a prueba, 7 de 8 tumores de Wilms sometidos a prueba, 3 de 3 tumores rhabdoides sometidos a prueba y 12 de 27 adenocarcinomas sometidos a prueba también presentaron resultados de prueba positivos. En cambio, m8H9 no se unió a tejidos humanos normales incluyendo médula ósea, colon, estómago, corazón, pulmón, músculo, glándula tiroidea, testículos, páncreas y cerebro humano (lóbulo frontal, cerebelo, puente y médula espinal) (Modak *et al.*, 2001 Cancer Res 61:4048-4054).

Agentes de anticuerpo 8H9

Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos 8H9 se unen específicamente a B7H3. A diferencia de otros anticuerpos anti-B7H3 sometidos a prueba, sólo 8H9 puede usarse para unirse al bucle FG de B7H3 y para bloquear la función de inhibición inmunitaria de B7H3.

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que m8H9 es ampliamente reactivo con tumores sólidos humanos, incluyendo tumores y carcinomas embrionarios (Modak *et al.*, 2001, Cancer Res. 61:4048-4054). m8H9 ha mostrado una captación tumoral favorable tanto para sarcoma como para tumores cerebrales en modelos de xenoinjerto (Modak *et al.*, 2005, Cancer Biother. Radiopharm. 20:534-546; Luther *et al.*, 2008, Neurosurgery 63:1166-1174; discusión 1174), y cuando se conjuga el anticuerpo con factor de veneno de cobra, induce una lisis tumoral mediada por el complemento eficaz (Juhl *et al.*, 1997, Immunobiology 197:444-459). Además, se mostró que la forma Fv de cadena sencilla (scFv) de m8H9 puede seleccionar como diana una potente inmunotoxina frente a sarcomas y gliomas en un sistema de modelo preclínico (Onda *et al.*, 2004, Cancer Res. 64:1419-1424; Luther *et al.*, 2010, Mol. Cancer Ther. 9:1039-1046).

Como parte de un receptor de antígeno quimérico (CAR), la forma scFv de m8H9 puede dirigir linfocitos citotóxicos naturales para destruir células tumorales positivas para B7H3(+) (Cheung *et al.*, 2003, Hybrid Hybridomics 22:209-218). Además, determinados ensayos clínicos con seres humanos en fase temprana han mostrado que la radioinmunoterapia con 8H9 marcado con ¹³¹I prolonga la supervivencia de pacientes de alto riesgo con cáncer metastásico del sistema nervioso central (SNC) (Kramer *et al.*, 2007, American Association for Cancer Research LB-4 (presentación); Kramer *et al.*, 2008, presentación en el ISPNO 2008).

Varios ensayos clínicos en fase 1 están actualmente en curso para radioinmunoterapia basada en m8H9 de metástasis leptomeningeas (NCT00089245) (Kramer *et al.*, 2010 J Neurooncol 97:409-418) y glioma pontino intrínseco difuso (GPID) (NCT01502917) (Zhou *et al.*, 2013, J. Neurooncol. 111:257-264). Según el conocimiento de los inventores, el único otro anticuerpo anti-B7H3 sometido a un ensayo clínico es MGA271, un AcM IgG1 humanizado (NCT01391143) (Loo *et al.*, 2012, Clin. Cancer. Res. 18:3834-3845, 2012).

Un anticuerpo m8H9 radiomarcado está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores desmoplásicos de células redondas y pequeñas y otros tumores sólidos que afectan al peritoneo (ID de protocolo de NCI 09-090 NCT01099644).

Ratón

8H9 murino (m8H9) es un anticuerpo monoclonal (AcM) IgG1 que selecciona como diana B7H3.

Humanizado y madurado por afinidad

Aunque m8H9 es prometedor como agente terapéutico para el tratamiento de cáncer en seres humanos, es de origen murino. En este contexto se prefiere el uso de anticuerpos humanos, entre otras cosas porque reduce la probabilidad de reacciones inmunitarias contra el anticuerpo administrado.

La invención proporciona determinadas secuencias de anticuerpo humanizado y también determinadas secuencias de anticuerpo madurado por afinidad, encontradas en anticuerpos que se unen a B7H3, y particularmente a su bucle FG. Por ejemplo, se muestran particularmente a modo de ejemplo en el presente documento agentes de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, u otros formatos de agentes de anticuerpo tal como se describe en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica) que incluyen polipéptidos que contienen elementos de secuencia tal como se describe en el presente documento.

En particular, la presente invención proporciona un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína

2Ig-B7H3 y que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7 y 8 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma, y/o que incluye una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 15 y 16 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma.

5

SEQ ID NO: 1 (cadena ligera de ch8H9)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYHLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRF
SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2 (cadena ligera de L1 de hu8H9)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCLASQSIDYHLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPAR
FSGSGSGTEFTLTISVQPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO: 3 (cadena ligera de L2 de hu8H9)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCLASQSIDYHLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARF
SGSGSGTEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 4 (cadena ligera de L3 de hu8H9)

EIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSIDYHLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARF
SGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5 (cadena ligera de 3.1 de hu8H9)

15

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCLASQSIDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPARF
SGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 6 (cadena ligera de 4.1 de hu8H9)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCLASQSIDYHLHWYQQKSHQAPRLLIKYASQSIGIPAR
FSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 7 (cadena ligera de 5.1 de hu8H9)

EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSISDYLYWYQQKSHQAPRLLIKYASQSISGIPAR
FSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 8 (cadena ligera de 6.1 de ch8H9; ch8H9 + 6 mutaciones de maduración por afinidad)

DIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSCRASQSISDYLYWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSR
FSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9 (cadena pesada de ch8H9)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGLVTV
SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO: 10 (cadena pesada de H1 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYFCARQTTATWFAYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (cadena pesada de H2 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12 (cadena pesada de H3 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13 (cadena pesada de 3.1 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO: 14 (cadena pesada de 4.1 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGRVTMTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAYWGQGLTLTV
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 15 (cadena pesada de 5.1 de hu8H9)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKTSQYFTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGRVTMTTDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTTLV
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16 (cadena pesada de 6.1 de ch8H9; ch8H9 + 6 mutaciones de maduración por afinidad)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSQYFTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAYWGQGLTTLV
SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

El agente de anticuerpo proporcionado es o comprende un anticuerpo que es un miembro de la clase de anticuerpos IgG.

10 Los agentes de anticuerpo proporcionados, incluyendo anticuerpos y/o porciones características de los mismos, o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, pueden producirse mediante cualquier medio disponible. En la técnica se conocen bien tecnologías para generar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales). Se apreciará que puede usarse una amplia gama de especies animales para la producción de antisueros, incluyendo conejo, ratón, rata, hámster, cobaya o cabra. La elección del animal puede decidirse en función de la facilidad de manipulación, los costes o la cantidad deseada de sueros, tal como conocerá un experto en la técnica. Se apreciará que también pueden producirse agentes de anticuerpo de manera transgénica mediante la generación de un mamífero o una planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos en, y recuperarse a partir de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.

20 Los agentes de anticuerpo proporcionados (incluyendo anticuerpos y/o porciones características) pueden producirse, por ejemplo, utilizando un sistema de célula huésped modificado por ingeniería para expresar un ácido nucleico que codifica para anticuerpo de la invención. Alternativa o adicionalmente, los agentes de anticuerpo proporcionados pueden prepararse parcial o completamente mediante síntesis química (por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos automatizado).

25 Se describen tecnologías de producción y uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I. Cold Spring Harbor Laboratory (1 de diciembre de 1998). En la técnica se conocen tecnologías para producir agentes de anticuerpo modificados, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos reconstituidos, anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos, por ejemplo, fragmentos Fab', Fab, F(ab')₂); o anticuerpos biosintéticos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio (DAB), Fv, Fv de cadena

sencilla (scFv) y similares), y pueden encontrarse, por ejemplo, en Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives*, Springer Verlag (15 de diciembre de 2000; 1ª edición).

- 5 Las fuentes a modo de ejemplo para preparaciones de agentes de anticuerpo adecuadas para la invención incluyen medio de cultivo acondicionado derivado del cultivo de una línea celular recombinante que expresa una proteína de interés, o de un extracto celular, por ejemplo, de células productoras de anticuerpos, bacterias, células fúngicas, células de insecto, células vegetales o plantas transgénicas, células animales o animales transgénicos, o suero de animales, líquido ascítico, sobrenadantes de hibridoma o mieloma. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de células de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 y cualquier cepa de *E. coli* que no logra escindir ADN foráneo. Las células huésped fúngicas adecuadas que pueden usarse incluyen células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Las células de insecto adecuadas incluyen células Schneider S2, células D. Mel-2, células SF9, SF21, High-5™, Mimic™-SF9, MG1 y KC1. Las líneas celulares recombinantes a modo de ejemplo adecuadas incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c, retinoblastos humanos (PER.C6), células de riñón de mono, línea de riñón embrionario humano (293), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humanas (HeLa), células de riñón de cánido, células de hígado de rata Buffalo, células de pulmón humanas, células de hígado humanas, células de tumor de mama de ratón, células TRI, células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).
- 10 Los agentes de anticuerpo de interés pueden expresarse usando cualquier vector apropiado. En la técnica se conoce una variedad de vectores (por ejemplo, vectores virales); las células en las que se han introducido tales vectores (o progenie de tales células) pueden cultivarse tal como se conoce en la técnica (por ejemplo, usando sistemas de cultivo continuo o discontinuo). En algunas realizaciones, las células pueden modificarse por ingeniería genética; en la técnica se conocen bien tecnologías para modificar por ingeniería genética células para expresar polipéptidos modificados por ingeniería (por ejemplo, polipéptidos de agentes de anticuerpo, tal como se describe en el presente documento). Véase, por ejemplo, Ausabel *et al.*, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York).
- 15
- 20
- 25

30 En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo proporcionados pueden purificarse, si se desea, usando filtración, centrifugación y/o una variedad de tecnologías cromatográficas tales como HPLC o cromatografía por afinidad. En algunas realizaciones, se obtienen fragmentos de agentes de anticuerpo proporcionados mediante métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante escisión de enlaces disulfuro por reducción química.

35 En general, tal como se describe en el presente documento, los agentes de anticuerpo proporcionados pueden ser o incluir, por ejemplo, un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo; un anticuerpo modificado, tal como un anticuerpo quimérico, anticuerpo reconformado, anticuerpo humanizado o fragmento de los mismos (por ejemplo, Fab', Fab, F(ab')₂); o un anticuerpo biosintético, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo de un solo dominio (DAB), Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) o similares.

40 Se apreciará que los agentes de anticuerpo proporcionados pueden modificarse por ingeniería, producirse y/o purificarse de tal manera como para mejorar las características y/o la actividad de los agentes de anticuerpo. Por ejemplo, las características mejoradas de los agentes de anticuerpo proporcionados incluyen estabilidad aumentada, avidez y/o afinidad de unión mejoradas, especificidad de unión aumentada, producción aumentada, agregación reducida, unión inespecífica reducida, entre otras.

Realizaciones a modo de ejemplo específicas - Combinaciones de cadenas ligeras y pesadas

45 En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 1 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 1 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 9.

50 En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 2 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 2 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 10.

55 En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 3 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 3 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 4 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 4 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 12.

En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 2 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 2 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 3 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 3 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 5 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 5 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 13.

En algunos aspectos de la divulgación, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 6 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos de la divulgación, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 6 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 7 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 7 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 8 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo es un anticuerpo que incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 8 y/o una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 16.

La presente invención contempla, entre otras cosas, los anticuerpos indicados a continuación que incluyen cadenas ligeras de inmunoglobulina tal como se expone en las SEQ ID NO indicadas, o porciones de unión a epítipo de las mismas, y cadenas pesadas de inmunoglobulina tal como se expone en las SEQ ID NO indicadas, o porciones de unión a epítipo de las mismas.

TABLA 1

N.º de anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada
37	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 13
39	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15
40	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 16
53	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 13
55	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 15
56	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 16
61	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 13
63	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
64	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 16

Realizaciones a modo de ejemplo específicas - Residuos de aminoácido específicos

En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina que incluye un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34, y/o una cadena pesada de inmunoglobulina que incluye un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102.

En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo porta una sustitución de aminoácidos

homólogos con respecto a la treonina en la posición 20 de la cadena ligera, la tirosina en la posición 34 de la cadena ligera, la treonina en la posición 24 de la cadena pesada, la glicina en la posición 42 de la cadena pesada, el ácido aspártico en la posición 56 de la cadena pesada y la glicina en la posición 102 de la cadena pesada.

- 5 En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de anticuerpo incluye una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7 y 8, incluyendo un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34, y/o incluye una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 15 y 16, incluyendo un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102.
- 10 En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de anticuerpo es anticuerpo 8H9 murino, en el que una cadena ligera de inmunoglobulina incluye un residuo de treonina en la posición 20 y un residuo de tirosina en la posición 34, y en el que una cadena pesada de inmunoglobulinas incluye un residuo de treonina en la posición 24, un residuo de glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56 y un residuo de glicina en la posición 102.
- 15 Entre otras cosas, la presente divulgación demuestra que la presencia de estos residuos de aminoácido en un agente de anticuerpo 8H9 aumenta la afinidad de unión del agente de anticuerpo a B7H3 con respecto a la observada con m8H9. Es decir, la introducción de estos residuos en m8H9 mejora su afinidad de unión a B7H3, y particularmente al bucle FG de su dominio V.
- 20 Los expertos en la técnica conocen una variedad de tecnologías, bien establecidas en la técnica, para lograr tal introducción, o para preparar, proporcionar o producir de otro modo polipéptidos que contienen tales secuencias. Se proporcionan tecnologías a modo de ejemplo útiles con respecto a esto, por ejemplo, en Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Realizaciones a modo de ejemplo específicas - Afinidades específicas

- 25 La presente divulgación proporciona la primera demostración de que pueden usarse agentes de anticuerpo, incluyendo agentes de anticuerpo 8H9, que seleccionan como diana el bucle FG de B7H3, para bloquear la función de inhibición inmunitaria de B7H3.
- 30 La presente invención proporciona agentes de anticuerpo que se unen específicamente al epítipo expuesto en SEQ ID NO: 32 (expuesta a continuación) ubicado en el bucle FG en el dominio V de la proteína 2Ig-B7H3 y en los dominios V1 y V2 de la proteína 4Ig-B7H3, y agentes de anticuerpo que se unen específicamente al mismo epítipo con una constante de disociación (K_D) de menos de 2 nM. Tal como se da a conocer en los ejemplos en el presente documento, el anticuerpo 8H9 humanizado y madurado por afinidad descrito, y fragmentos de unión del mismo, tienen estas características. En algunas realizaciones, estos agentes de anticuerpo no son m8H9.
- 35 El epítipo de IRDF está conservado entre especies y se encuentra, por ejemplo, en seres humanos, perros, chimpancés, orangutanes, gibones, macacos, tífes, cerdos, caballos, pandas y elefantes. La presente invención proporciona agentes de anticuerpo que se unen específicamente al epítipo expuesto en SEQ ID NO: 32 que está presente en seres humanos y animales no humanos, incluyendo perros, chimpancés, orangutanes, gibones, macacos, tífes, cerdos, caballos, pandas y elefantes.
- SEQ ID NO: 32 es IRDF
- 40 En determinadas realizaciones de la presente invención, los agentes de anticuerpo se unen al bucle FG en el dominio V de la proteína 2Ig-B7H3 y en los dominios V1 y V2 de la proteína 4Ig-B7H3 con una K_D (nM) de menos de 100 nM, menos de 80 nM, menos de 50 nM, menos de 30 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM y menos de 2 nM.
- En algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de anticuerpo suprimen el efecto inhibitorio de B7H3 sobre la proliferación y función de células T.
- 45 En algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de anticuerpo suprimen el efecto inhibitorio de B7H3 sobre la proliferación y función de células T y/o potencian la citotoxicidad mediada por células T.
- En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo tal como se describe en el presente documento suprime un efecto inhibitorio de B7H3 sobre la actividad y/o función de linfocitos citolíticos naturales.
- 50 En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo tal como se describe en el presente documento suprime un efecto inhibitorio de B7H3 sobre la actividad y/o función de linfocitos citolíticos naturales y/o potencia la actividad y/o función de linfocitos citolíticos naturales.
- En la técnica se conocen ampliamente ensayos para determinar tales efectos. En los ejemplos en el presente documento se proporcionan algunos ensayos a modo de ejemplo.
- En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo comprenden y/o son anticuerpos y/o scFv.

Realizaciones a modo de ejemplo específicas - CDR específicas

Tal como se conoce generalmente en la técnica, los anticuerpos humanos y murinos están habitualmente compuestos por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, que comprenden, cada una, regiones variables y regiones constantes. La región variable de cadena ligera comprende habitualmente 3 CDR (regiones determinantes de complementariedad), identificadas en el presente documento como CDRL1, CDRL2 y CDRL3, flanqueadas por regiones de marco. La región variable de cadena pesada comprende habitualmente 3 CDR, identificadas en el presente documento como CDRH1, CDRH2 y CDRH3, flanqueadas por regiones de marco (véase, por ejemplo, William E. Paul, *Fundamental Immunology* (7ª ed.), Lippincott Williams & Wilkins 2013).

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena ligera de inmunoglobulina que incluye una CDRL1 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 39, 40, 45, 46, 51 y 52 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena ligera de inmunoglobulina que incluye una CDRL2 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 36, 41, 42, 47, 48, 53 y 54 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena ligera de inmunoglobulina que incluye una CDRL3 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38, 43, 44, 49, 50, 55 y 56 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una CDRH1 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75 y 76 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una CDRH2 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60, 66, 72 y 78 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, un agente de anticuerpo que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 incluye una cadena pesada de inmunoglobulina que incluye una CDRH3 expuesta en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 62, 68, 74 y 80 (expuestas a continuación), o una porción de unión a epítipo relevante de la misma. En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo es un anticuerpo, un scFv y/o una porción de unión a epítipo relevante del mismo.

La presente invención contempla agentes de anticuerpo que incluyen las CDR expuestas a continuación en cualquier combinación posible. Por ejemplo, la invención incluye agentes de anticuerpo que incluyen una CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 que son SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 62, respectivamente.

La producción de anticuerpos que tienen CDR y/o regiones de marco deseadas se conoce generalmente en la técnica y se describe, por ejemplo, en Strohl & Strohl, *Therapeutic Antibody Engineering*, Woodhead Publishing Limited 2012.

	CDRL1	CDRL2	CDRL3
	Kabat		
m8h9, ch8H9	RASQSISDYLH SEQ ID NO: 33	YASQSIS SEQ ID NO: 35	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 37
3.1, 5.1 de hu8H9	RASQSISDYLH SEQ ID NO: 34	YASQSIS SEQ ID NO: 36	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 38
	Chothia		
m8h9, ch8H9	SQSISDY SEQ ID NO: 39	YAS SEQ ID NO: 41	GHSFPL SEQ ID NO: 43
3.1, 5.1 de hu8H9	SQSISDY SEQ ID NO: 40	YAS SEQ ID NO: 42	GHSFPL SEQ ID NO: 44
	Honegger		
m8h9, ch8H9	ASQSISDY SEQ ID NO: 45	YASQSISGIPSR SEQ ID NO: 47	GHSFPL SEQ ID NO: 49
3.1, 5.1 de hu8H9	ASQSISDY SEQ ID NO: 46	YASQSISGIPAR SEQ ID NO: 48	GHSFPL SEQ ID NO: 50
	IMGT		
m8h9, ch8H9	QSISDY SEQ ID NO: 51	YAS SEQ ID NO: 53	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 55
3.1, 5.1 de hu8H9	QSISDY SEQ ID NO: 52	YAS SEQ ID NO: 54	QNGHSFPLT SEQ ID NO: 56
	CDRH1	CDRH2	CDRH3
	Kabat		
m8h9, ch8H9	NYDIN SEQ ID NO: 57	WIFPGDGSTQYNEKFKG SEQ ID NO: 59	QTTATWFAY SEQ ID NO: 61
3.1, 5.1 de hu8H9	NYDIN SEQ ID NO: 58	WIFPGDDSTQYNEKFKG SEQ ID NO: 60	QTTGTWFAY SEQ ID NO: 62
	Chothia		
m8h9, ch8H9	GYTFTNY SEQ ID NO: 63	PGDG SEQ ID NO: 65	TTATWFA SEQ ID NO: 67
3.1, 5.1 de hu8H9	GYTFTNY SEQ ID NO: 64	PGDD SEQ ID NO: 66	TTGTWFA SEQ ID NO: 68
	Honegger		
m8h9, ch8H9	ASGYTFTNYD SEQ ID NO: 69	IFPGDGSTQYNEKFKGKA SEQ ID NO: 71	QTTATWFA SEQ ID NO: 73
3.1, 5.1 de hu8H9	TSGYTFTNYD SEQ ID NO: 70	IFPGDDSTQYNEKFKGRV SEQ ID NO: 72	QTTGTWFA SEQ ID NO: 74
	IMGT		
m8h9, ch8H9	GYTFTNYD SEQ ID NO: 75	IFPGDGST SEQ ID NO: 77	ARQTTATWFAY SEQ ID NO: 79
3.1, 5.1 de hu8H9	GYTFTNYD SEQ ID NO: 76	IFPGDDST SEQ ID NO: 78	ARQTTGTWFAY SEQ ID NO: 80

Formatos de agente de anticuerpo

- Los expertos en la técnica, al leer la presente divulgación, apreciarán que las secuencias de anticuerpo proporcionadas, o porciones de unión a epítipo de las mismas, pueden incorporarse de manera útil en cualquiera de una variedad de formatos de polipéptido basados en inmunoglobulina u otros; por tanto, realizaciones de la invención incluyen una variedad de polipéptidos y formatos de polipéptido incluyendo elementos de secuencia, o porciones de unión a epítipo de los mismos, tal como se describe en el presente documento. Dentro de tales polipéptidos y formatos de polipéptido proporcionados se incluyen aquellos que se unen específicamente a B7H3, y particularmente a su bucle FG. En algunas realizaciones particulares, los polipéptidos y/o formatos de polipéptido proporcionados compiten con m8H9 por la unión a B7H3, por ejemplo, a su bucle FG.

Fv de cadena sencilla (scFv)

- Los Fv de cadena sencilla (scFv) se conocen ampliamente y se usan en la técnica. Un Fv de cadena sencilla es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulinas, con frecuencia conectadas por un ligador peptídico corto (véase, por ejemplo, véase, por ejemplo, Benny K. C. Lo (ed.), Antibody Engineering - Methods and Protocols, Humana Press 2004, y las referencias citadas en el mismo).

La presente invención también proporciona Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen específicamente a la proteína B7H3 y que incluyen un polipéptido tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27 (expuestas a continuación). En los ejemplos en el presente documento se describen

adicionalmente polipéptidos tal como se exponen en las SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

En algunas realizaciones de la presente invención, un polipéptido de scFv se conjuga con un agente terapéutico o agente de detección, o comprende una treonina en la posición 24, una glicina en la posición 42, un residuo de ácido aspártico en la posición 56, un residuo de glicina en la posición 102, un residuo de treonina en la posición 153 y un residuo de tirosina en la posición 167. Los 6 residuos de aminoácido específicos en estas 6 posiciones específicas se describen adicionalmente en los ejemplos.

En algunas realizaciones de la presente invención, estos residuos de aminoácido se sustituyen por un aminoácido homólogo (es decir, aquellos con características similares).

Tal como conoce el experto en la técnica, la generación de scFv y su modificación según la presente invención es rutinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Benny K. C. Lo (ed.), *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, Humana Press 2004, y las referencias citadas en el mismo).

En algunas realizaciones de la presente invención, un polipéptido de scFv se fusiona a un segundo polipéptido.

En algunas realizaciones de la presente invención, un polipéptido de scFv tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27 se fusiona a un segundo polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 (expuestas a continuación) para crear un scFv en tándem biespecífico. SEQ ID NO: 28 incluye una secuencia de ligador peptídico y una secuencia de péptido de un scFv que se une a huOkt3 (anti-CD3), que forma parte del complejo de receptor de células T. De manera similar, SEQ ID NO: 29 incluye una secuencia de ligador peptídico y una secuencia de péptido de un fragmento de anticuerpo scFv C825 anti-DOTA.

La utilidad del scFv en tándem biespecífico se conoce ampliamente y se acepta en la técnica, y es similar a la utilidad de anticuerpos biespecíficos, que se describen en otra parte en el presente documento. Tal como conoce el experto en la técnica, la generación de scFv y su modificación, incluyendo la producción de scFv en tándem biespecíficos, según la presente invención, es rutinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Benny K. C. Lo (ed.), *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, Humana Press 2004, y las referencias citadas en el mismo).

En algunas realizaciones, un scFv que incluye el polipéptido tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27 se fusiona con su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29. En algunas realizaciones, un scFv que incluye el polipéptido tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27 se fusiona con su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

SEQ ID NO: 17 (scFv de H3L3 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAIWGQGTLLTVV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVSLSCRASQSSISDYLHWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 18 (scFv de clon S3.3 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAIWGQGTLLTVV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSSISDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 19 (scFv de clon S7.2 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASCKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTATWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGVGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSKRASQSIGDYLYWYQKKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 20 (scFv de clon S7.17 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWVGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARQTTSTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSKRASQPISDYLYWYQKKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGYSFPLTFGQGTKL
ELKR

5 SEQ ID NO: 21 (scFv de clon S7.22 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDDTSTSTAYMELSSLRPEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSKRASQSIGDYLYWYQKKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 22 (scFv de clon S7.28 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDDTSTSTAYMELSSLGSEDTAVYFCTRQTTATWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSSGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSKRASQSIGDYLYWYQKKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 23 (scFv de clon S7.29 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTDDTSTSTAYLELSSLGSEDTAVYFCARQTTGTWFAYWGQGTLLTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSKRASQSIGDYLYWYQKKSHE
SPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

10

SEQ ID NO: 24 (scFv de 3.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAFWGQGTTLVT
SSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSHE
SPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGQGTKL
ELKR

SEQ ID NO: 25 (scFv de 4.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTNYDINWVRQRPQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGRVTMTTDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYFCARQTTATWFAFWGQGTTLVT
VSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSH
QAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTK
LELKR

5 SEQ ID NO: 26 (scFv de 5.1 de hu8H9) es

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGRVTMTTDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYFCARQTTGTWFAFWGQGTTLVT
VSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSH
QAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGSEFTLTISLQPEDFGVYYCQNGHSFPLTFGQGTK
LELKR

SEQ ID NO: 27 (scFv de 6.1 de ch8H9) es

QVQLQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTNYDINWVRQRPQGGLWIGWIFPGDDST
QYNEKFKGKATLTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTGTWFAFWGQGTTLVT
SAGGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVTLSRASQSSISDYLYWYQQKSH
ESPRLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTK
LELKR

SEQ ID NO: 28 (scFv de huOKT3 (anti-CD3) de ligador) es

GGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG
KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYD
DHYCLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS
SSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLSGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYY
CQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

10

SEQ ID NO: 29 (scFv de C825 (anti-DOTA) de ligador) es

GGGSGGGSGGGSGSHVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSY
PYNFYDAWGC GTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSST
GAVTASNYANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDE
AIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

Anticuerpos biespecíficos

5 Los anticuerpos biespecíficos se conocen ampliamente y se usan en la técnica. Los anticuerpos biespecíficos son proteínas artificiales que incluyen fragmentos de dos o más anticuerpos diferentes y, por consiguiente, se unen a dos o más tipos diferentes de antígenos.

En algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos biespecíficos incluyen dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, un agente de anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, tiene dos especificidades, una de las cuales se une a B7H3 y la otra de las cuales se une a CD3 en células T o DOTA.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina descrita en el presente documento se fusiona a un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 (expuestas a continuación). SEQ ID NO: 30 incluye una secuencia de ligador peptídico y una secuencia de péptido de un scFv que se une a huOKT3 (anti-CD3), que forma parte del complejo de receptor de células T. De manera similar, SEQ ID NO: 31 incluye una secuencia de ligador peptídico y una secuencia de péptido de un fragmento de anticuerpo scFv C825 anti-DOTA. Después se combinan las proteínas de fusión de cadena ligera-scFv resultantes con cualquiera de las cadenas pesadas descritas en el presente documento.

SEQ ID NO: 30 (scFv de huOKT3 (anti-CD3) de ligador)

GGGSGGGSGGGSGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG
KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTG VYFCARYYD
DHYCLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS
SSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYY
CQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

20 SEQ ID NO: 31 (scFv de C825 (anti-DOTA) de ligador)

GGGSGGGSGGGSGSHVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSY
PYNFYDAWGC GTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSST
GAVTASNYANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDE
AIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

25 La fusión de cadenas ligeras de inmunoglobulina con SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31, y el posterior emparejamiento con una cadena pesada de inmunoglobulina, crea anticuerpos biespecíficos que se unen a tipos diferentes de antígenos. Se entiende que la generación de proteínas de fusión de anticuerpo es convencional en la técnica y se realiza de manera rutinaria usando técnicas de biología molecular ampliamente conocidas y usadas. Pueden usarse anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, para anclar células tumorales y células inmunitarias entre sí (uno de los antígenos unidos está ubicado en la célula tumoral y el otro antígeno está ubicado en la célula inmunitaria).

Conjugados

30 En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo tal como se describe en el presente documento se asocia con una entidad de carga útil. En algunas realizaciones, una entidad de carga útil es o comprende un agente terapéutico; en algunas realizaciones, una entidad de carga útil es o comprende un agente de detección.

Agentes terapéuticos

Los agentes terapéuticos pueden ser o comprender cualquier clase de entidad química incluyendo, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas orgánicas, polímeros no biológicos, metales, iones, radioisótopos. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos para su uso según la presente invención pueden tener una actividad biológica relevante para el tratamiento de uno o más síntomas o causas de cáncer. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos para su uso según la presente invención pueden tener una actividad biológica relevante para la modulación del sistema inmunitario y/o la potenciación de la citotoxicidad mediada por células T y/o la supresión del efecto inhibitorio de B7H3 sobre la proliferación y función de células T. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos para su uso según la presente invención tienen una o más de otras actividades.

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente terapéutico conjugado es un radioisótopo, un conjugado de fármaco, una nanopartícula, una inmunotoxina o cualquier otra carga útil terapéutica.

Agentes de detección

Un agente de detección comprende cualquier resto que puede detectarse usando un ensayo, por ejemplo, debido a sus propiedades funcionales y/o características químicas específicas. Los ejemplos de tales agentes incluyen enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad, partículas coloreadas o ligandos tales como biotina.

En la técnica se conocen muchos agentes de detección, al igual que sistemas para su unión a anticuerpos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.021.236; 4.938.948; y 4.472.509). Los ejemplos de tales agentes de detección incluyen iones paramagnéticos, isótopos radiactivos, fluorocromos, sustancias detectables por RMN, agentes de formación de imágenes por rayos X, entre otros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ion paramagnético es uno o más de cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III), lantano (III), oro (III), plomo (II) y/o bismuto (III).

El isótopo radiactivo puede ser uno o más de actinio-225, ástato-211, bismuto-212, carbono-14, cromo-51, cloro-36, cobalto-57, cobalto-58, cobre-67, europio-152, galio-67, hidrógeno-3, yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, indio-111, hierro-59, plomo-212, lutecio-177, fósforo-32, radio-223, radio-224, renio-186, renio-188, selenio-75, azufre-35, tecnecio-99m, torio-227, itrio-90 y circonio-89. Pueden producirse agentes de anticuerpo marcados radiactivamente según tecnologías bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden yodarse anticuerpos monoclonales mediante el contacto con yoduro de sodio y/o potasio y un agente oxidante químico, tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Los agentes de anticuerpo proporcionados pueden marcarse con tecnecio-99m mediante un procedimiento de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo pertecnetato con disolución estannosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna. En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo proporcionados se marcan usando técnicas de marcaje directo, por ejemplo, incubando pertecnetato, un agente reductor tal como SnCl_2 , una disolución tampón tal como disolución de ftalato de sodio-potasio y el anticuerpo. Grupos funcionales intermedios que se usan con frecuencia para unir radioisótopos que existen como iones metálicos a anticuerpo son ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) o p-aminobencil-DOTA (DOTA-Bn). Los isótopos radiactivos pueden detectarse, por ejemplo, mediante dosimetría.

Un marcador fluorescente puede ser o puede comprender uno o más de Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, azul cascada, Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, verde de Oregón 488, verde de Oregón 500, verde de Oregón 514, azul pacífico, REG, verde de rodamina, rojo de rodamina, renografina, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y/o rojo de Texas, entre otros.

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente de detección conjugado es un agente de diagnóstico o de formación de imágenes.

Preparación de conjugados

En la técnica se conocen varias tecnologías en la técnica para la unión o conjugación de un agente de anticuerpo a un agente terapéutico o de detección. Algunas tecnologías de unión implican el uso de un complejo de quelato de metal que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como un anhídrido de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilendiaminotetracético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o tetracloro-3 α -6 α -difencilgliciril-3 unido al anticuerpo (patentes estadounidenses n.ºs 4.472.509 y 4.938.948). Los agentes de anticuerpo proporcionados también pueden hacerse reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína, por ejemplo, se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante reacción con un isotiocianato.

Identificación y/o caracterización de agentes de anticuerpo anti-B7H3 útiles

La presente divulgación proporciona la primera demostración de que pueden usarse agentes de anticuerpo, incluyendo agentes de anticuerpo 8H9, que seleccionan como diana el bucle FG de B7H3, para bloquear la función de inhibición inmunitaria de B7H3. Por tanto, la presente divulgación demuestra el deseo de identificar y/o caracterizar agentes de anticuerpo con tal actividad. La presente divulgación también proporciona una variedad de sistemas para realizar tal identificación y/o caracterización. En algunas realizaciones, por ejemplo, se evalúa directamente la unión. En algunas realizaciones, se evalúa el efecto sobre la proliferación, activación y/o función de células T. En algunas realizaciones, se evalúa la modulación inmunitaria. En algunas realizaciones, se evalúa la inhibición y/o el bloqueo de punto de control inmunitario. En algunas realizaciones, se evalúa la muerte de células tumorales, la selección como diana de células tumorales y/o la destrucción de células efectoras. En algunas realizaciones, se evalúa la competencia con un agente de anticuerpo 8H9 tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se evalúa la eficacia terapéutica en comparación con un agente de anticuerpo 8H9 tal como se describe en el presente documento.

Composiciones

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye un agente de anticuerpo, scFv o anticuerpo humanizado de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden proporcionarse en una forma inyectable estéril (por ejemplo, una forma que es adecuada para inyección subcutánea o infusión intravenosa). Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas en una forma de dosificación líquida que es adecuada para inyección. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas como polvos (por ejemplo, liofilizados y/o esterilizados), opcionalmente a vacío, que se reconstituyen con un diluyente acuoso (por ejemplo, agua, tampón, solución salina) antes de la inyección. En algunas realizaciones, se diluyen y/o reconstituyen composiciones farmacéuticas en agua, disolución de cloruro de sodio, disolución de acetato de sodio, disolución de alcohol bencílico, solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, debe mezclarse suavemente polvo con el diluyente acuoso (por ejemplo, no agitarse).

Las composiciones farmacéuticas contempladas como parte de la presente invención no están limitadas a composiciones farmacéuticas que son inyectables, sino que incluyen todos los tipos de composiciones farmacéuticas habitualmente conocidas y usadas en la técnica.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más conservantes. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas no comprenden ningún conservante. Los excipientes tal como se usa en el presente documento pueden ser o comprender disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) da a conocer una variedad de excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio de excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir cualquier efecto biológico no deseable o al interaccionar de otro modo de una manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, se contempla que su uso está dentro del alcance de esta invención.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas en una forma que puede refrigerarse y/o congelarse. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas en una forma que no puede refrigerarse y/o congelarse. En algunas realizaciones, las disoluciones reconstituidas y/o formas de dosificación líquidas pueden almacenarse durante un determinado periodo de tiempo después de la reconstitución (por ejemplo, 2 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, un mes, dos meses o más).

Las formas de dosificación líquidas y/o disoluciones reconstituidas pueden comprender material particulado y/o alteración del color antes de la administración. En algunas realizaciones, no debe usarse una disolución si produce alteración del color o turbidez y/o si queda material particulado tras la filtración.

Pueden prepararse formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento mediante cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en la técnica de farmacología. En algunas realizaciones, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con uno o más excipientes y/o uno o más de otros componentes complementarios y, después, si es necesario y/o deseable, conformar y/o acondicionar el producto para dar una unidad de una sola dosis o de múltiples dosis deseada.

Una composición farmacéutica según la invención puede prepararse, acondicionarse y/o comercializarse a granel, como una dosis unitaria individual y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual

a una dosis que se administrará a un sujeto y/o una fracción conveniente de una dosis de este tipo, tal como, por ejemplo, la mitad o una tercera parte de una dosis de este tipo.

- 5 Las cantidades relativas de principio activo, excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier componente adicional en una composición farmacéutica según la invención pueden variar, dependiendo de la identidad, el tamaño y/o el estado del sujeto tratado y/o dependiendo de la vía por la que va a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de principio activo.

Usos

Tratamiento de cáncer y mitigación de la inmunosupresión

- 10 La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento de cáncer mediante la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de anticuerpo, scFv o anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Puede determinarse si la administración de un agente de anticuerpo trata el cáncer mediante metodologías conocidas, incluyendo las descritas en los ejemplos en el presente documento.

- 15 La presente divulgación también proporciona métodos de modulación del sistema inmunitario y/o potenciación de la citotoxicidad mediada por células T y/o supresión del efecto inhibidor de B7H3 sobre la proliferación y función de células T en un sujeto mediante la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de anticuerpo, scFv o anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Puede determinarse si la administración de un agente de anticuerpo modula el sistema inmunitario y/o potencia la citotoxicidad mediada por células T mediante metodologías conocidas, incluyendo las descritas en los ejemplos en el presente documento.

- 20 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos de modulación del sistema inmunitario y/o potenciación de funciones mediadas por linfocitos citolíticos naturales y/o supresión del efecto inhibidor de B7H3 sobre la actividad y/o función de linfocitos citolíticos naturales en un sujeto, por ejemplo, mediante la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de anticuerpo, scFv o anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Puede determinarse si la administración de un agente de anticuerpo modula el sistema inmunitario y/o potencia la actividad y/o función de linfocitos citolíticos naturales mediante metodologías conocidas, incluyendo las descritas en el presente documento.

- 25 En algunas realizaciones, la cantidad exacta administrada puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de uno o más factores tal como se conoce bien en las técnicas médicas. Tales factores pueden incluir, por ejemplo, uno o más de especie, edad, estado general del sujeto, gravedad de la infección, composición particular, su modo de administración, su modo de actividad, el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del agente de anticuerpo específico empleado; la composición farmacéutica específica administrada; la semivida de la composición después de la administración; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o simultáneos con el compuesto específico empleado y similares. Pueden formularse composiciones farmacéuticas en una forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico encargado dentro del alcance del criterio médico razonable.

- 30 En algunas realizaciones, la cantidad exacta administrada puede ser una cantidad de un agente de anticuerpo tal como se describe en el presente documento para lograr eficazmente uno o más efectos moduladores descritos en el presente documento, que, al menos en algunas realizaciones, incluyen modular la supresión, la inhibición o el bloqueo por B7H3 de la actividad y/o función de células T y/o linfocitos citolíticos naturales.

- 35 Los agentes de anticuerpo según la presente invención y composiciones farmacéuticas de los mismos según la presente invención pueden administrarse según cualquier vía y régimen apropiado. En algunas realizaciones, una vía o un régimen es uno que se ha correlacionado con un beneficio terapéutico positivo. En algunas realizaciones, una vía o un régimen es uno que se ha aprobado por la FDA y/o EP.

- 40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía, tal como apreciarán los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía oral (v.o.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea (s.c.), intraventricular, transdérmica, interdérmica, intradérmica, rectal (v.r.), vaginal, intraperitoneal (i.p.), intragástrica (i.g.), tópica (por ejemplo, mediante polvos, pomadas, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, intranasal, bucal, enteral, vítrea, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial, y/o inhalación; como pulverización oral, pulverización nasal y/o aerosol, y/o mediante un catéter de la vena porta.

- 45 En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo según la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse por vía intravenosa, por ejemplo, mediante infusión intravenosa. En realizaciones específicas, los agentes de anticuerpo según la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse mediante inyección intramuscular. En realizaciones específicas,

los agentes de anticuerpo según la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse mediante inyección subcutánea. En realizaciones específicas, los agentes de anticuerpo según la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse mediante catéter de la vena porta. Sin embargo, la invención engloba la administración de agentes de anticuerpo según la presente invención y/o composiciones farmacéuticas de los mismos mediante cualquier vía apropiada teniendo en consideración posibles avances en las ciencias de administración de fármacos.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo según la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos según la invención pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para administrar desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de sujeto al día para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosificación deseada puede administrarse más de tres veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada dos meses, cada seis meses o cada doce meses. En determinadas realizaciones, la dosificación deseada puede administrarse usando múltiples administraciones (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Terapia de combinación

El experto habitual en la técnica apreciará que pueden emplearse agentes de anticuerpo según la presente invención y/o composiciones farmacéuticas de los mismos en terapias de combinación.

La combinación particular de terapias (por ejemplo, productos terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que va a lograrse. También se apreciará que pueden emplearse composiciones farmacéuticas de la presente invención en terapias de combinación (por ejemplo, terapias de combinación de anticuerpos), es decir, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse simultáneamente con, antes de o posteriormente a, uno o más de otros procedimientos terapéuticos deseados.

Pueden combinarse cantidades terapéuticamente eficaces de agentes de anticuerpo según la invención en una composición farmacéutica proporcionada, con al menos otro principio activo. En algunas realizaciones, otro principio activo es un agente antineoplásico, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, inhibidores de ARN polimerasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de helicasa, inmunomoduladores, compuestos antisentido, ARN de interferencia cortos, ARN de horquilla cortos, microARN, aptómeros de ARN, ribozimas y combinaciones de los mismos. La combinación particular de terapias que va a emplearse en un régimen de combinación tendrá generalmente en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que va a lograrse. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno, o pueden lograr efectos diferentes.

Se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo fin o pueden lograr efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). La invención engloba la administración de composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y/o modificar su distribución dentro del organismo.

En algunas realizaciones, los agentes utilizados en combinación se utilizarán a niveles que no superan los niveles a los que se usan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles usados en combinación serán inferiores a los usados individualmente.

En algunas realizaciones, la terapia de combinación puede implicar administraciones de una pluralidad de agentes de anticuerpo dirigidos a un único epítipo (por ejemplo, un único epítipo conformacional). En algunas realizaciones, la terapia de combinación puede comprender una pluralidad de agentes de anticuerpo que reconocen distintos epítopos, por ejemplo, para interferir simultáneamente con múltiples mecanismos en el proceso de tumorigénesis.

Un experto en la técnica apreciará que cualquier permutación o combinación de agentes de anticuerpo según la presente invención puede combinarse con cualquier otro agente de anticuerpo para formular composiciones y/o regímenes de terapia de combinación que comprenden una pluralidad de agentes de anticuerpo diferentes.

Ácidos nucleicos

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona ácidos nucleicos (incluyendo ADN y ARN, por ejemplo) que codifican para un agente de anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona ácidos nucleicos que son complementarios a ácidos nucleicos que codifican para un agente de anticuerpo de la invención.

En algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que se hibridan con ácidos nucleicos

que codifican para un agente de anticuerpo. Tales ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, como cebadores o como sondas. Para dar simplemente algunos ejemplos, tales ácidos nucleicos pueden usarse como cebadores en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como sondas para hibridación (incluyendo hibridación *in situ*) y/o como cebadores para PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

- 5 En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más nucleótidos no naturales. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos sólo incluyen nucleótidos naturales.

La generación y manipulación de ácidos nucleicos que codifican para agentes de anticuerpo y, en particular, anticuerpos y fragmentos de unión a epítipo de los mismos, se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden clonarse en uno cualquiera de los muchos sistemas y vectores de expresión conocidos en la técnica, y después transfectarse en células de elección para expresar los ácidos nucleicos en cultivo tisular, usando tecnologías ampliamente conocidas en la técnica. Los ejemplos de células dentro del alcance de la invención con respecto a esto son células inmunitarias de manera general, y células T y otras células presentadoras de antígeno más en particular. Véase, por ejemplo, Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no debe interpretarse que limiten el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

20 Resultados

Cristalización de ch8H9

La estructura cristalina del fragmento Fab de ch8H9 se determinó mediante sustitución molecular usando la entrada de PDB (3D85) y se refinó a una resolución de 2,5 Å. Los datos estadísticos de recopilación y refinamiento se establecen en la tabla 2 (los datos estadísticos para la vaina de mayor resolución se muestran entre paréntesis). El modelo final se depositó en el Banco de Datos de Proteínas (código de registro 5CMA).

La estructura de Fab de ch8H9 tiene dominios de pliegue de inmunoglobulina comunes a todas las estructuras de Fab, y los seis bucles de CDR (H1, H2, H3, L1, L2 y L3) que forman el sitio de reconocimiento de antígeno tenían densidades de electrones bien definidas (véase la figura 1). El potencial de superficie electrostático del sitio de unión a antígeno se calculó usando DelPhi (figura 1C; Rocchia, W. *et al.*, 2002, J. Comput. Chem. 23: 128-137). El centro del sitio de unión tiene una gran área de superficie cargada positivamente dominada por los bucles L3 y H3. Dos cavidades de área superficial cargada negativamente (en las regiones del bucle H2 y L1) flanquean la región central, lo que indica que el antígeno reconocido por 8H9 tiene una distribución de carga superficial mixta.

TABLA 2

Longitud de onda (Å)	0,9795
Intervalo de resolución (Å)	29 - 2,495 (2,584 - 2,495)
Grupo espacial	C 2 2 2 ₁
Celda unitaria (Å)	64,576, 207,422, 85,491
Celda unitaria (°)	90, 90, 90
Reflexiones únicas	20043 (1957)
Integridad (%)	98,03 (97,12)
I/sigma (I) medio	10,18 (2,30)
Factor B de Wilson	55,01
R de trabajo	0,2080 (0,3037)
R libre	0,2606 (0,3421)
Número de átomos distintos de hidrógeno	3303
macromoléculas	3254
agua	49
Residuos proteicos	426
RMS (enlaces)	0,003
RMS (ángulos)	0,87
Ramachandran favorecido (%)	94,0
Ramachandran permitido (%)	4,6
Valores atípicos de Ramachandran (%)	1,4
Factor B promedio	69,70
macromoléculas	69,90
disolvente	58,50

Humanización de m8H9

Las CDR de las cadenas pesada y ligera de m8H9 se injertaron en regiones de marco de IgG1 basándose en su homología con las secuencias de la línea germinal humana IGHV1-46 para la cadena pesada e IGKV-7 para la cadena ligera. Se generaron dos versiones, H1 y H2, de la cadena pesada humanizada, conteniendo H1 más secuencias de molde humanas. También se generaron dos versiones, L1 (SEQ ID NO: 2) y L2 (SEQ ID NO: 3), de la cadena ligera humanizada, conteniendo L1 más secuencias de molde humanas. Luego se clonaron, expresaron y purificaron cuatro versiones del anticuerpo IgG1 8H9 humanizado (H1L1 [SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 2], H1L2 [SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3], H2L1 [SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 2] y H2L2 [SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 3]), junto con una IgG1 quimérica (ch) 8H9.

La figura 3 y la tabla 3 a continuación muestran las propiedades de unión de m8H9 y ch8H9 contra B7H3 determinadas mediante resonancia de plasmón superficial. Ambos anticuerpos tenían cinéticas de unión muy similares (K_D de 0,28 nM y 0,74 nM, respectivamente).

La figura 4 y la tabla 4 a continuación muestran las propiedades de unión de las cuatro IgG1 8H9 humanizadas (hu8H9). La variante H1L1 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 2), que contenía la mayor parte del contenido humano, se unió a B7H3 de manera más débil (K_D de 112 nM) que las otras tres variantes, que, sin embargo, también mostraron sólo una capacidad de unión inferior a la óptima (K_D de 34,8-38,6 nM).

TABLA 3

Cinética de la unión de m8H9 y ch8H9 a 2Ig-B7H3-mFc tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial			
Construido	K_{on} ($S^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
m8H9	$3,674 \times 10^4$	$1,033 \times 10^{-5}$	0,28
ch8H9	$4,738 \times 10^4$	$3,506 \times 10^{-5}$	0,74

TABLA 4

Cinética de la unión de variantes de hu8H9 a 4Ig-B7H3 tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial			
Anticuerpo	4Ig-B7H3		
	k_{on}	k_{off}	K_D (nM)
IgG1 hu8H9-H1L1	$2,61 \times 10^4$	$1,86 \times 10^{-3}$	111,8
IgG1 hu8H9-H1L2	$3,64 \times 10^4$	$1,27 \times 10^{-3}$	34,8
IgG1 hu8H9-H2L1	$4,08 \times 10^4$	$1,35 \times 10^{-3}$	34,8
IgG1 hu8H9-H2L2	$4,40 \times 10^4$	$1,66 \times 10^{-3}$	38,6

Para mejorar la unión de hu8H9 a B7H3, se generó y simuló un modelo estructural de m8H9 usando campos de fuerza CHARMM. Se realizó mutagénesis *in silico* para analizar los efectos de cada posible mutación humanizante. La tabla 5 a continuación muestra las 6 mutaciones (cadena ligera: S20T, S69T, I106L; cadena pesada: V12K, R40A, E42G) en la región de marco que conducirán a la desestabilización de la estructura inherente de m8H9. Se introdujo la inversa de estas 6 mutaciones (cadena ligera: T20S, T69S, I106L; cadena pesada: K12V, A40R, G42E) en H1L2 de hu8H9 para crear H3L3 de hu8H9 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4). Las mutaciones se realizaron basándose en cálculos de energía *in silico*, que es un método no convencional de humanización y optimización de anticuerpos. El método convencional de humanización de anticuerpos implica el injerto de CDR y la realización de retromutaciones basándose en la homología de secuencia y la proximidad a residuos de CDR. Los constructos H1L1, H1L2, H2L1 y H2L2 se realizaron mediante métodos de injerto de CDR convencionales.

TABLA 5

Análisis mutacional <i>in silico</i> del modelo de homología de m8H9 usado para diseñar H3L3 de hu8H9			
Residuo de ratón	Mutación	Energía de mutación ponderada (kcal/mol)	Efecto
LC: Ser20	Thr	+1,181	Desestabilizador
LC: Ser69	Thr	+0,759	Desestabilizador
LC: Leu106	Ile	+2,078	Desestabilizador
HC: Val12	Lys	+5,563	Desestabilizador

HC: Arg40	Ala	+1,170	Desestabilizador
HC: Glu42	Gly	+0,695	Desestabilizador

Posteriormente al diseño de H3L3 de hu8H9 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) basándose en el modelado de homología, se resolvió la estructura cristalina del fragmento Fab de ch8H9 a 2,5 Å. En un esfuerzo por aumentar el contenido humano de H3L3 de hu8H9, se simuló la estructura cristalina del fragmento Fab de ch8H9 con campos de fuerza CHARMM y se realizó mutagénesis *in silico* para analizar los efectos de cada posible mutación humanizante una vez más. La tabla 6 y la tabla 7, ambas a continuación, muestran 7 mutaciones en la cadena ligera (S20T, E42Q, S43A, N76S, V78L, E79Q, V83F) y 5 mutaciones en la cadena pesada (L20V, K67R, A68V, L70M y A79V) que se predijo que estabilizarían la estructura de 8H9. Estas 12 mutaciones humanizantes se incorporaron en H3L3 de hu8H9 para generar 4.1 de hu8H9 (SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6). Estas mutaciones se realizaron basándose en cálculos de energía *in silico*, que es un método no convencional de humanización y optimización de anticuerpos.

TABLA 6

Análisis mutacional <i>in silico</i> de la estructura cristalina de ch8H9 usada para diseñar la cadena ligera de 4.1 de hu8H9			
Secuencia en ch8H9 y LC de H3L3	Secuencia de molde humano	Ubicación	Energía de mutación (kcal/mol)
S20	T	superficie	-0,5
E42	Q	superficie	-1,1
S43	A	V _H /V _L	-4,5
N76	S	superficie	-4,5
V78	L	interna	-2,8
E79	Q	superficie	-3,8
V83	F	superficie	-2,5

TABLA 7

Análisis mutacional <i>in silico</i> de la estructura cristalina de ch8H9 usada para diseñar la cadena pesada de 4.1 de hu8H9		
Secuencia en ch8H9 y HC de H3L3	Secuencia de molde humano	Energía de mutación (kcal/mol)
L20	V	-0,1
K67	R	-2,8
A68	V	-1,2
L70	M	-1,0
A79	V	-1,7

Maduración por afinidad mediante presentación en levadura

Se usó un constructo de B7H3 biotinilado para ayudar en la selección de anticuerpos 8H9 humanizados madurados por afinidad particularmente deseables. Para este enfoque, se expresó 4Ig-B7H3 fusionada con Fc de ratón en células DG44 CHO. Para la biotinilación, se usó biotina activada por NHS para reaccionar eficazmente con grupos amino primario (-NH₂) en la cadena lateral de residuos de lisina (K) y el extremo N-terminal de los polipéptidos. El exceso de biotina sin reaccionar se retiró mediante exclusión molecular usando columnas de ultrafiltro. La biotinilación satisfactoria del antígeno B7H3-mFc se validó mediante tinción con estreptavidina conjugada con HRP en un ELISA (figura 5A). La detección de B7H3-Fc biotinilado mediante IgG 8H9 quimérica de ratón/ser humano confirmó que el resto de biotina no obstaculizaba la unión específica del anticuerpo 8H9 a B7H3-Fc (figura 5B).

Para aumentar la afinidad de H3L3 de hu8H9 humanizado, se convirtió en un scFv y se mutagenizó aleatoriamente mediante PCR propensa a errores. Anteriormente, se usó con éxito la presentación en levadura para una maduración adicional de anticuerpos ya que permite una distinción excelente entre mutantes mediante citometría de flujo. Por tanto, la biblioteca mutante se presentó en células de levadura mediante recombinación homóloga con un vector que contenía una etiqueta c-myc. Se generó una biblioteca de levadura mutante de tamaño relativamente grande (hasta 10⁸) y se sometió en primer lugar a una preselección mediante el uso de perlas magnéticas conjugadas con B7H3-mFc biotinilada, permitiendo la eliminación de células de levadura que no expresaban anticuerpos o se unían débilmente al antígeno. A continuación, se clasificó la biblioteca mutante varias veces

mediante FACS para seleccionar la unión a B7H3 en condiciones rigurosas (figura 6). Se mutaron adicionalmente las variantes de scFv clasificadas mediante PCR propensa a errores de todo el gen para producir una nueva subbiblioteca. A continuación, se repitió cíclicamente el procedimiento de clasificación y mutagénesis. Los clones que se unen más fuertemente a B7H3 se obtuvieron de la tanda final de maduración (figura 6). Las levaduras derivadas de la última (la 7ª) tanda de clasificación mostraron una unión significativamente más fuerte que la levadura que presentaba H3L3 de hu8H9 parental (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) (figura 7), cuando se tiñeron con el antígeno B7H3-mFc. Estos resultados indicaron que los mutantes de levadura enriquecidos tenían una afinidad de unión significativamente aumentada en comparación con el compuesto parental no mutagenizado. Se identificaron los clones de mayor afinidad a partir de la tanda final de maduración. Los datos de secuencia de agentes de unión fuertes se agruparon mediante análisis de agrupaciones. Las siguientes variantes de scFv se seleccionaron repetidamente: S7.2 (SEQ ID NO: 19), S7.17 (SEQ ID NO: 20), S7.22 (SEQ ID NO: 21), S7.28 (SEQ ID NO: 22) y S7.29 (SEQ ID NO: 23) (figura 8).

Propiedades de unión de mutantes de scFv seleccionados

En un ELISA, las variantes de scFv seleccionadas por FACS mostraron una mejor unión a las formas o bien 4lg o bien 2lg de B7H3 que la observada con la H3L3 de hu8H9 parental o con S3.3 (clasificación 3) (figura 9). Se comparó la unión de diferentes variantes de 8H9 a antígeno 4lg-B7H3 recubierto sobre chips CM5 mediante resonancia de plasmón superficial usando Biacore T-100. Los valores de K_D obtenidos de todas las variantes seleccionadas, incluyendo H3L3 de hu8H9 y S3.3, se indican en la tabla 8 a continuación.

TABLA 8

Análisis Biacore de scFv expresado de manera recombinante contra 4lgB7H3			
Construido de scFv	K_{on} ($S^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
H3L3 de hu8H9	$6,3 \times 10^3$	$9,185 \times 10^{-4}$	144,0
S3.3	$2,481 \times 10^4$	$2,443 \times 10^{-4}$	9,85
S7.2	$2,543 \times 10^4$	$1,432 \times 10^{-4}$	5,6
S7.17	$5,097 \times 10^4$	$1,134 \times 10^{-4}$	2,2
S7.22	$8,614 \times 10^4$	$9,989 \times 10^{-5}$	1,2
S7.28	$4,751 \times 10^3$	$1,318 \times 10^{-3}$	277,4
S7.29	$5,593 \times 10^4$	$1,519 \times 10^{-4}$	2,7

Las variantes de scFv a partir de la séptima clasificación se unieron al antígeno con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 6 nM, 2 nM, 1 nM, 277 nM y 3 nM, en comparación con las constantes de disociación (K_D) de 144 nM y 10 nM observadas para el H3L3 de hu8H9 parental y S3.3, respectivamente. Entre las variantes de scFv de la séptima clasificación, S7.17, S7.22 y S7.29 de scFv mostraron la mayor afinidad de unión, logrando una mejora de la afinidad de más de 50 veces. S7.22 de scFv (SEQ ID NO: 21) en particular dio como resultado una mejora de unión de más de 100 veces en comparación con scFv de H3L3 de hu8H9 parental (SEQ ID NO: 17).

Inmunotinción de células tumorales mediante variantes de scFv maduras por afinidad

Se comparó la unión de las variantes de scFv de H3L3 de hu8H9 (SEQ ID NO: 17), S3.3 (SEQ ID NO: 18) y S7.22 (SEQ ID NO: 21) a células de neuroblastoma M14 (figura 10). Se encontró que scFv S7.22 mostró una mejor unión que las variantes de scFv Hu8H9 y S3.3.

Determinación de mutaciones potenciadoras de afinidad clave

La tabla 9 a continuación indica las seis mutaciones identificadas a partir de secuencias clasificadas por maduración por afinidad (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G). Cuatro de las mutaciones (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G) se derivaron de la tercera tanda de clasificación (clon S3.3 [SEQ ID NO: 18]) y posteriormente se presentaron en la mayoría de las clones de la séptima tanda de clasificación.

TABLA 9

Las mutaciones identificadas a partir de levadura muestran maduración por afinidad	
Mutación	Ubicación
LC: S20T	Región de marco
LC: H34Y	CDRL1
HC: A24T	Región de marco
HC: E42G	Región de marco
HC: G56D	CDR H2
HC: A102G	CDR H3

El clon de mayor afinidad, S7.22, tiene dos mutaciones adicionales (HC: G56D, HC: A102G). Tres de las mutaciones identificadas están directamente en la región CDR (LC: H34Y, HC: G56D, HC: A102G). Dos de las mutaciones (LC: S20T, HC: E42G) tienen la misma secuencia que el molde de la línea germinal humana usado para la humanización.

Variantes humanizadas y potenciadas por afinidad

Las seis mutaciones de maduración por afinidad (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G) se incorporaron en la secuencia de H3L3 de hu8H9 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4) para generar variantes de scFv e IgG1 de 3.1 de hu8H9 (SEQ ID NO: 24). La secuencia de 4.1 de hu8H9 (SEQ ID NO: 25) ya contenía una de las mutaciones identificadas a partir de la maduración por afinidad (LC: S20T) y las cinco mutaciones adicionales (LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G) se incorporaron para generar scFv de 5.1 de hu8H9 (SEQ ID NO: 26) y variantes de IgG1.

La cinética de unión de las variantes de scFv de H3L3 (SEQ ID NO: 17), 3.1 (SEQ ID NO: 24), 4.1 (SEQ ID NO: 25) y 5.1 (SEQ ID NO: 26) de hu8H9 se presentan en la tabla 10 a continuación.

TABLA 10

Análisis Biacore del constructo de scFv de H3L3, 3.1, 4.1 y 5.1 de hu8H9			
Constructo scFv	K_{on} ($S^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
H3L3 de hu8H9	$6,379 \times 10^3$	$9,185 \times 10^{-4}$	144,0
3.1 de hu8H9	$1,035 \times 10^5$	$9,525 \times 10^{-5}$	0,92
4.1 de hu8H9	$1,217 \times 10^4$	$5,565 \times 10^{-4}$	45,7
5.1 de hu8H9	$5,878 \times 10^4$	$9,841 \times 10^{-5}$	1,7

Tal como puede observarse, la adición de mutaciones potenciadoras de la afinidad dio como resultado afinidades de unión sustancialmente más altas (K_D de 0,9 nM para 3.1 de hu8H9 y K_D de 1,7 nM para 5.1 de hu8H9), en comparación con la afinidad de unión de secuencias no maduras por afinidad.

La cinética de la unión de anticuerpos IgG1 ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1), H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), H3L3 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4), 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) y 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) a 4Ig-B7H3-Fc se presentan en la figura 11 y la tabla 11 a continuación.

TABLA 11

Cinética de unión de IgG ch8H9 y H1L2, H3L3, 3.1 y 5.1 de hu8H9 a 4Ig-B7H3 tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial			
Constructo	K_{on} ($S^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
ch8H9	$4,481 \times 10^4$	$5,491 \times 10^{-5}$	1,2
H1L2 de hu8H9	$5,596 \times 10^5$	$2,394 \times 10^{-2}$	42,7
H3L3 de hu8H9	$6,827 \times 10^6$	$4,519 \times 10^{-2}$	6,6
3.1 de hu8H9	$5,559 \times 10^4$	$1,136 \times 10^{-4}$	2,0
5.1 de hu8H9	$5,918 \times 10^4$	$7,081 \times 10^{-5}$	1,3

La variante humanizada H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), que se diseñó mediante tecnologías de injerto de CDR convencionales, tiene una unión sustancialmente más débil que la de ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) (K_D de 42,7 nM para H1L2 de hu8H9 y K_D de 1,2 nM para ch8H9). Tal como se describe en el presente documento, se usó un método novedoso de modelado informático basado en cálculos de energía y simulaciones de dinámica

molecular según la presente invención para generar H3L3 de hu8H9, lo que dio como resultado una mejora sustancial en la afinidad (6,6 nM). La incorporación de mutaciones potenciadoras de la afinidad dio como resultado una mejora adicional y dio como resultado 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) y 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) de hu8H9 (K_D de 2,0 y 1,3 nM, respectivamente), que tienen características de unión comparables a las de ch8H9. Se observaron potenciaciones similares en la unión a 2Ig-B7H3-Fc (figura 12 y tabla 12 a continuación).

TABLA 12

Cinética de unión de IgG ch8H9 y H1L2, H3L3, 3.1 y 5.1 de hu8H9 a 2Ig-B7H3 determinada mediante resonancia de plasmón superficial			
Construto	K_{on} ($S^{-1}M^{-1}$)	K_{off} (S^{-1})	K_D (nM)
ch8H9	$4,957 \times 10^4$	$3,792 \times 10^{-5}$	0,76
H1L2 de hu8H9	$1,698 \times 10^4$	$1,162 \times 10^{-3}$	68,4
H3L3 de hu8H9	$4,667 \times 10^5$	$3,501 \times 10^{-2}$	7,5
3.1 de hu8H9	$3,871 \times 10^4$	$2,321 \times 10^{-4}$	6,0
5.1 de hu8H9	$6,783 \times 10^4$	$5,588 \times 10^{-5}$	0,82

Se sometió a prueba la unión de ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) y H1L2 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 3), 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) y 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) de hu8H9 a células tumorales de melanoma M14 positivas para B7H3 y los datos resultantes se presentan en la figura 13. La unión de 3.1 y 5.1 de Hu8H9 fue comparable a la unión de ch8H9, y sustancialmente más fuerte que la de H1L2 de hu8H9.

Se determinó la cinética de unión para los constructos de IgG (m8H9, ch8H9, H3L3 de hu8H9 y 3.1 de hu8H9) a 4Ig-B7-H3 y 2Ig-B7-H3 sin fusión de Fc (tabla 13). Tanto los anticuerpos m8H9 como ch8H9 se unieron al 2Ig-B7-H3 con mayor afinidad que al 4Ig-B7-H3, lo que indica que el epítipo de unión puede estar más completamente expuesto en el formato 2Ig-B7-H3. La IgG H3L3 de hu8H9 (K_D de 33 nM para 4Ig-B7H3 y K_D de 45 nM para 2Ig-B7-H3) tuvo una pérdida parcial de afinidad en comparación con ch8H9 (K_D de 7,7 nM para 4Ig-B7H3 y K_D de 2,7 nM para 2Ig-B7-H3). El 3.1 de hu8H9 madurado por afinidad tuvo una potenciación de 2,5 a 9 veces en la afinidad (K_D de 13 nM para 4Ig-B7H3 y K_D de 5,0 nM para 2Ig-B7-H3) en comparación con el H3L3 de hu8H9 parental. Debido a que 3.1 de hu8H9 no tenía mayor afinidad que ch8H9, se incorporaron las 6 mutaciones de maduración por afinidad (LC: S20T, LC: H34Y, HC: A24T, HC: E42G, HC: G56D, HC: A102G) en IgG ch8H9 para generar 6.1 de ch8H9. La cinética de unión de 6.1 de ch8H9 fue K_D de 3,7 nM para 4Ig-B7H3 y K_D de 0,6 nM para 2Ig-B7-H3, lo que demostró una potenciación de 2 a 4 veces en la unión con respecto a ch8H9.

TABLA 13

Cinética de unión para constructos de IgG a 4Ig-B7-H3 y 2Ig-B7-H3 sin fusión de Fc						
Anticuerpos	4Ig-B7-H3			2Ig-B7-H3		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
m8H9	$1,846 \times 10^4$	$1,650 \times 10^{-4}$	8,9	$2,776 \times 10^4$	$2,244 \times 10^{-5}$	0,81
ch8H9	$2,834 \times 10^4$	$2,180 \times 10^{-4}$	7,7	$3,210 \times 10^4$	$8,729 \times 10^{-5}$	2,7
6.1 de ch8H9	$3,349 \times 10^4$	$1,229 \times 10^{-4}$	3,7	$6,890 \times 10^4$	$4,254 \times 10^{-5}$	0,62
H3L3 de hu8H9	$2,046 \times 10^4$	$6,770 \times 10^{-4}$	33	$1,347 \times 10^4$	$6,069 \times 10^{-4}$	45
3.1 de hu8H9	$2,342 \times 10^4$	$2,979 \times 10^{-4}$	13	$3,394 \times 10^4$	$1,711 \times 10^{-4}$	5,0

Propiedades de destrucción de tumores *in vitro* de los anticuerpos 8H9

A continuación se sometieron a prueba *in vitro* las propiedades de ADCC de destrucción de tumor de cinco constructos de anticuerpos IgG (m8H9, ch8H9, 6.1 de ch8H9, H3L3 de hu8H9 y 3.1 de hu8H9) usando células tumorales de neuroblastoma LAN-1 como dianas y PBMC humanas como células efectoras. La citotoxicidad se midió mediante liberación de ^{51}Cr (figura 14 y tabla 14). m8H9 no tenía ninguna función de ADCC con PBMC humanas, lo cual es de esperar para el isotipo IgG1 murino. Los constructos ch8H9 y H3L3 de hu8H9 mostraron una potente ADCC (CE_{50} de 1,4 y 0,7 $\mu g/ml$, respectivamente). El 6.1 de ch8H9 (CE_{50} de 0,1 $\mu g/ml$) tuvo una mejora de 14 veces en la citotoxicidad con respecto a ch8H9 y 3.1 de hu8H9 (CE_{50} de 0,3 $\mu g/ml$) tuvo una potenciación de 2 veces en la destrucción con respecto a H3L3 de hu8H9 y una potenciación de 5 veces en la destrucción con respecto a ch8H9.

TABLA 14

Ensayo de ADCC <i>in vitro</i> de constructos de IgG anti-B7-H3		
Anticuerpos	CE ₅₀ (µg/ml)	Cambio en veces de CE ₅₀ con respecto a ch8H9
m8H9	sin destrucción	
ch8H9	1,40 ± 0,08	
6.1 de ch8H9	0,10 ± 0,01	14 veces
H3L3 de hu8H9	0,70 ± 0,03	2 veces
3.1 de hu8H9	0,31 ± 0,03	5 veces
5.1 de hu8H9	0,16 ± 0,02	9 veces

Selección como diana in vivo de xenoinjertos de neuroblastoma humano

Se determinó la biodistribución *in vivo* de los constructos de anticuerpo 8H9 (3.1 de hu8H9 y 6.1 de ch8H9 en comparación con m8H9 y ch8H9) usando xenoinjertos de ratón. En resumen, todos los anticuerpos se radiomarcaron con ¹³¹I y se determinó su inmunorreactividad *in vitro* contra células LAN-1 (m8H9: 69%, ch8H9: 75%, 6.1 de ch8H9: 73% y 3.1 de hu8H9: 54%). Se analizaron las biodistribuciones *in vivo* de cada anticuerpo a las 48 horas tras la inyección usando ratones que portaban xenoinjertos de neuroblastoma LAN-1 subcutáneo (figura 15 y tabla 15 [prom.: promedio]). La captación tumoral medida mediante el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% de DI/g) fue del 8,9% para m8H9, el 6,1% para ch8H9, el 6,8% para 6.1 de ch8H9 y el 10,6% para 3.1 de hu8H9. Las razones de tumor con respecto a tejido normal se muestran en la tabla 16 (prom.: promedio). Todos los anticuerpos sometidos a prueba tenían razones comparables de tumor con respecto a no tumor para la mayoría de los tejidos. La captación tumoral más alta se observó para 3.1 de hu8H9, que fue estadísticamente más alta que ch8H9 (*p* < 0,05) y una razón de tumor con respecto a sangre más alta que ch8H9 (1,26 en comparación con 0,72, *p* < 0,05). Se observó una captación tumoral ligeramente menor para 6.1 de ch8H9, pero una razón de tumor con respecto a sangre comparable.

TABLA 15

Biodistribución de anticuerpos 8H9 marcados con ¹³¹ I en xenoinjertos LAN-1 en ratones								
N	% de DI/g							
	m8H9		ch8H9		6.1 de ch8H9		3.1 de hu8H9	
	5	5	5	5	4	4	4	4
Órgano	Prom.	EEM	Prom.	EEM	Prom.	EEM	Prom.	EEM
Tumor	8,85	0,96	6,13	0,69	6,85	1,71	10,59	1,95
Corazón	3,36	0,24	3,01	0,21	2,05	0,33	2,25	0,45
Pulmones	3,72	0,36	3,83	0,23	3,02	0,80	3,37	0,78
Hígado	3,14	0,31	2,81	0,20	2,30	0,37	2,67	0,55
Bazo	1,78	0,17	1,60	0,15	1,18	0,18	1,61	0,30
Estómago	1,64	0,23	1,09	0,11	0,89	0,09	0,95	0,07
Intestino delgado	1,21	0,04	0,92	0,11	0,63	0,09	0,55	0,11
Intestino grueso	0,52	0,08	0,45	0,05	0,32	0,05	0,33	0,06
Riñón	2,99	0,22	2,52	0,25	1,65	0,28	1,89	0,31
Glándula suprarrenal	2,76	0,36	2,49	0,41	1,86	0,46	2,82	0,68
Piel	3,83	0,08	3,62	0,14	2,39	0,24	2,50	0,45
Fémur	1,76	0,10	1,28	0,11	0,90	0,18	1,32	0,06
Músculo	1,20	0,11	0,88	0,06	1,08	0,45	0,77	0,11
Médula espinal	1,47	0,07	1,15	0,07	0,98	0,09	1,01	0,15
Cerebro	0,29	0,03	0,22	0,02	0,15	0,02	0,18	0,03
Cola	2,38	0,17	1,70	0,10	1,63	0,34	1,54	0,19
Sangre	10,38	0,49	8,70	0,50	5,77	0,79	8,21	0,63

TABLA 16

Razones de captación de tumor con respecto a no tumor de anticuerpos 8H9 marcados con ¹³¹ I en ratones con xenoinjertos LAN-1								
N	Razón de tumor con respecto a no tumor							
	m8H9		ch8H9		6.1 de ch8H9		3.1 hu8H9	
	5		5		4		4	
Órgano	Prom.	EEM	Prom.	EEM	Prom.	EEM	Prom.	EEM
Tumor	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Corazón	2,67	0,31	2,09	0,28	4,09	1,62	4,98	0,66
Pulmones	2,52	0,43	1,64	0,22	2,79	0,98	3,46	0,58
Hígado	2,90	0,32	2,29	0,41	3,39	1,24	4,30	0,69
Bazo	5,18	0,74	4,03	0,67	6,96	2,75	6,67	0,54
Estómago	6,40	1,98	5,77	0,71	7,89	1,99	11,05	1,59
Intestino delgado	7,29	0,63	7,11	1,05	13,03	5,04	20,50	3,13
Intestino grueso	22,37	8,90	14,50	2,23	22,75	6,29	32,86	3,47
Riñón	3,02	0,38	2,64	0,54	4,53	1,49	5,64	0,47
Glándula suprarrenal	3,31	0,33	2,92	0,75	3,88	0,74	3,94	0,37
Piel	2,31	0,24	1,73	0,26	2,92	0,76	4,42	0,55
Fémur	5,04	0,48	5,12	1,06	7,96	1,63	7,96	1,31
Músculo	7,46	0,58	7,00	0,72	8,27	2,93	15,17	3,74
Médula espinal	6,04	0,61	5,49	0,82	7,01	1,67	10,54	0,87
Cerebro	32,65	6,03	30,60	6,62	47,54	12,77	63,35	10,18
Cola	3,80	0,49	3,67	0,47	4,74	1,35	6,77	0,59
Sangre	0,85	0,06	0,72	0,10	1,32	0,46	1,26	0,16

Determinación de epítipo

- 5 Se usaron tecnologías de acoplamiento molecular para predecir el epítipo molecular preciso en B7H3 responsable de la unión de 8H9. Específicamente, se generó un modelo de homología de 2Ig-B7H3 humano y luego se realizaron experimentos de acoplamiento con la estructura cristalina de Fab de ch8H9 usando ZDOCK. La figura 16 muestra el modelo predicho derivado de los cálculos de acoplamiento. El modelo muestra que 8H9 se une específicamente a la secuencia de IRDF (residuos 126-129, SEQ ID NO: 32) del bucle FG en el dominio V de 2Ig-B7H3. En 4Ig-B7H3, esta secuencia está presente dos veces (residuos 126-129 del dominio V1 y residuos 344-347 del dominio V2). Las energías de interacción predichas para cada uno de los residuos de interacción 2Ig-B7H3 del complejo acoplado se muestran en la tabla 17 a continuación. Arg127 y Asp128 tienen la energía de interacción más alta (-55,2 y -46,3 kcal/mol respectivamente).

TABLA 17

Energías de interacción calculadas a partir del modelo acoplado 8H9:B7H3	
Residuo de 2Ig-B7H3 (SEQ ID NO: 85)	Energía de interacción (kcal/mol)
Phe 123	-3,59
Val 124	-11,8
Ser 125	-14,2
Ile 126	-10,4
Arg 127	-55,2
Asp 128	-46,3
Phe 129	-1,33
Gly 130	-3,80

Basándose en el modelado molecular, se realizaron mutaciones puntuales de R127A y D128A en dos constructos

separados de 2Ig-B7H3-mFc y se expresaron de manera recombinante. La figura 17 muestra la cinética de unión de ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1) a los mutantes R127A y D128A de 2Ig-B7H3, junto con la cinética de unión de tres AcM anti-B7H3 disponibles comercialmente (MIH42 y 6A1 de Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL) y el clon 185504 de R&D Systems (Minneapolis, MN)). La UR máxima de unión a 2Ig-B7H3-Fc WT, así como la unión relativa de los mutantes R127A y D128A se muestran en la tabla 18. ch8H9 muestra una pérdida casi completa de unión (99,9%) en cuanto a la mutación R127A y una pérdida parcial de unión (40%) en cuanto a la mutación D128A en comparación con el constructo silvestre. Ninguno de los otros tres anticuerpos anti-B7H3 mostró una pérdida sustancial en la unión a ninguna proteína B7H3 mutante (es decir, los anticuerpos MIH42 y el clon 185504 conservaron ~70-75% de su unión respectiva a los mutantes R127A y D128A; el anticuerpo 6A1 tenía una unión global débil a 2Ig-B7H3 WT, y o bien la misma unión a R127A o bien unión elevada a los mutantes D128A). De manera similar a ch8H9 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 1), las variantes 3.1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5) y 5.1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 7) de hu8H9 también mostraron una pérdida total y parcial de unión (figura 18). Estos estudios de unión demostraron que ch8H9 era específico de manera única para la secuencia IRDF de B7H3. También se confirmó la pérdida de unión a mutantes de B7-H3 R127A y D128A mediante SPR para constructos 8H9 humanizados.

TABLA 18

Unidades de respuesta de unión a B7-H3 WT y mutantes D128A y R129			
Anticuerpo	UR máx.	Unión relativa	
	WT-2Ig-B7-H3	R127A	D128A
ch8H9	2875	0,1%	60,0%
MIH42	2526	76,1%	68,8%
6A1	196,1	109,1%	167,5%
clon 185504	3344	75,5%	74,9%

Uso de AcM 8H9 para la modulación inmunitaria

Se ha demostrado previamente que el bucle FG del dominio IgV de B7H3 desempeña un papel crítico en la función inhibidora de células T de las proteínas en el ratón. La B7H3 de ratón sólo existe en la forma 2Ig-B7H3, en la que la secuencia crítica responsable de la función inhibidora es IQDF (residuos 126-129, SEQ ID NO: 86). Se ha demostrado que m8H9 y los clones 3.1 y 5.1 se unen todos a la secuencia de IRDF homóloga (residuos 126-129) en B7H3 humana (SEQ ID NO: 32), y específicamente a Arg127. Además, m8H9 y sus formas humanizadas no se unen a B7H3 murina, que contiene Gln127. A diferencia de otros anticuerpos anti-B7H3 sometidos a prueba, sólo 8H9 puede usarse para unirse al bucle FG de B7H3, lo cual puede usarse para bloquear la función de inhibición inmunitaria de B7H3.

La figura 19 presenta datos que muestran que las células IMR-32 de neuroblastoma positivas para B7H3 pueden inhibir la proliferación de células T. En este ensayo, se observó una reducción del 60% en la proliferación de células T cuando estaban presentes células IMR-32. 8H9 quimérico suprime este efecto inhibitor sobre la proliferación de células T de una manera dependiente de la dosis e incluso potencia la proliferación de células T en presencia de células tumorales (figura 20).

También se sometió a prueba si m8H9 puede superar el efecto inhibitor de B7H3 sobre la función de las células T. Usando un anticuerpo biespecífico anti-Her2 x anti-CD3 (trastuzumab fusionado con scFv de huOKT3), se sometió a prueba si m8H9 podía potenciar la citotoxicidad mediada por células T de las células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa) positivas para Her2, positivas para B7H3 (figura 21). Se observó que cuando se incuban previamente células tumorales con 8H9, la destrucción máxima se potencia desde el 58% (sin tratamiento previo) hasta el 71% (con tratamiento previo con 8H9).

Estos conjuntos de experimentos son la primera demostración de que m8H9 y sus derivados pueden usarse para terapia de inmunomodulación.

Métodos

Modelado de homología

Se generaron modelos de homología de la región variable de 8H9 usando el servidor de modelado de anticuerpos ROSETTA y Discovery Studio 3.0 (Accelrys, San Diego, CA).

Cristalografía de rayos X

Se generaron fragmentos Fab de ch8H9 mediante digestión con papaína usando un kit de preparación de Fab convencional (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se concentró el fragmento Fab purificado hasta 10 mg/ml en HEPES 20 mM, pH 6,5, y luego se cristalizó en una gota colgante mediante difusión de vapor a 16°C contra un

depósito de reactivo de índice de Hampton que contenía sulfato de litio monohidratado 0,2 M, BIS-TRIS 0,1 M pH 6,5 y polietilenglicol al 25% p/v 3,350 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA). Se formó la gotita mezclando 1 µl de disolución de proteína y 1 µl de disolución de depósito. Se recopilaban los datos en la línea de haz 24IDE de Argonne Advanced Photon Source. Se resolvió la estructura de Fab mediante reemplazo molecular usando MolRep (serie CCP4) (McCoy, A. J. *et al.*, 2007, J. Appl. Crystallogr. 40: 658-674). El mejor modelo de reemplazo molecular se refinó usando Phenix (Adams, P. D. *et al.*, 2010, Acta crystallographica Section D Biological crystallography 66: 213-221), y se realizó el ajuste manual con O (Bailey, S., 1994, Acta Crystallogr. D 50: 760-763). La estructura de los cristales se resolvió a 2,5 Å.

Simulaciones moleculares de la estructura de ch8H9

Se simuló la estructura cristalina de ch8H9 usando campos de fuerza CHARMm (CHemistry at Harvard Molecular mechanics) y se calculó el efecto de cada mutación puntual a partir de la diferencia entre la energía libre de plegamiento de la proteína mutada y la silvestre. Se usó la aproximación de Born generalizada para tener en cuenta el efecto del disolvente y todos los términos electrostáticos se calcularon como una suma de interacciones coulombicas y contribuciones polares a la energía de solvatación. Se calculó una suma ponderada de los términos de van der Waals, electrostáticos, entropía y no polares para cada mutación puntual. Todos los cálculos se realizaron usando Discovery Studio 3.0 (Accelrys, San Diego, CA). Se sometieron a prueba mutaciones directas e inversas para determinar su efecto sobre la estabilidad de la próxima generación de hu8H9. Las simulaciones de acoplamiento se generaron usando el software ZDOCK (disponible a través de la Universidad de Boston, Boston, MA). Las simulaciones de acoplamiento se generaron usando ZDOCK (Chen, R. *et al.* 2003, Proteins 52: 80-87) y el modelado de homología de B7H3 se realizó usando MODELLER (Sánchez, R. y Sali, A., 1997, Proteins suppl. 1: 50-58). Los potenciales de superficie electrostáticos se generaron usando DelPhi (Rocchia, W. *et al.*, 2002, J. Comput. Chem. 23: 128-137).

Biotinilación del antígeno B7H3

El gen de la proteína de fusión B7H3 humana-Fc de ratón (mFc) se optimizó para la expresión en células CHO (Genscript, Piscataway, NJ). Usando el vector pBluescript (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), se transfectó el gen en células DG44 CHO y se expresó tal como se describió previamente (Cheung *et al.*, 2012 Oncolmunology 1: 477-486). La biotinilación de la proteína de fusión B7H3-mFc se realizó usando EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin y un kit de biotinilación (Thermo Scientific, Tewksbury, MA) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se concentró la proteína biotinilada usando un tubo de centrifuga Vivaspin de 50.000 de MWCO (Sartorius Stedim, Goettingen, Alemania) y se sometió a prueba su biotinilación en un ELISA de unión a estreptavidina.

Mutagénesis mediante PCR propensa a errores

Se realizó una PCR propensa a errores del gen de scFv (V3) de hu8H9 completo usando el kit de mutagénesis aleatoria Stratagene GeneMorph® II según las instrucciones del fabricante. En resumen, la PCR se llevó a cabo en una reacción de 50 µl que contenía 1 × tampón de reacción de Mutazyme II, 0,5 µM de cada uno de los cebadores ERRORF (5' TCAGTTTGGCCAGGCGGCC 3'; SEQ ID NO: 81) y ERRORR (5' ACCACTAGTTGGGGCCGGCCTG 3'; SEQ ID NO: 82), dNTP 0,2 mM (cada uno), 1 ng de molde de ADN, trifosfato de 8-oxo-desoxiguanosina 2 µM, 2'-desoxi-p-nucleósido-5'-trifosfato 2 µM y 2,5 U de ADN polimerasa Mutazyme II. Se desnaturalizaron las mezclas de reacción a 95°C durante 2 min, se sometieron a ciclos 35 veces a 95°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y finalmente se extendieron a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y cada uno de ellos se amplificó en cuatro reacciones de PCR de 100 µl que contenían mezcla de reacción de PCR 1x NEB, 1 µM de cebadores YDRDF (5' CTTGCTGTT TTCAATATT TTCTGTTATT GCTTCAGTTT TGGCCAGGC GGCC 3'; SEQ ID NO: 83) e YDRDR (5' GAGCCGCCAC CCTCAGAACC GCCACCCTCA GAGCCACCAC TAGTTGGGCC GGCCTG 3'; SEQ ID NO: 84), 120 ng de producto de PCR propensa a errores y 2,5 U de ADN polimerasa. Se sometieron las reacciones a ciclos térmicos usando 30 ciclos y tal como se describió de otro modo anteriormente. Se purificaron los productos de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se concentraron mediante ultrafiltración con agua.

Selección de mutantes de hu8H9 a partir de las bibliotecas de levadura

La construcción y el crecimiento de bibliotecas de levadura para la maduración por afinidad se modificaron a partir del protocolo publicado anteriormente (Zhao *et al.* 2011 Mol Cancer Ther 10: 1677-1685). Antes de la clasificación celular por fluorescencia (FACS), se incubó previamente la biblioteca de levadura (1×10⁹ células) con IgG 3F8 de ratón a TA durante 1 h, se preparó secuencialmente contra 10 µg de perlas magnéticas conjugadas con B7H3-mFc durante 1 h a TA en tampón PBSA (BSA al 0,1% en PBS), seguido por la separación con un soporte magnético. Se lavaron las perlas aisladas 3 veces con tampón PBSA, se resuspendieron en 10 ml de medio SDCAA y se cultivaron durante la noche en un agitador a 30°C a 250 rpm. Las células de levadura recuperadas a partir de perlas magnéticas se incubaron en medio SG/RCAA durante 18 h a 20°C con agitación a 250 rpm. Para la primera selección de FACS, se sedimentaron aproximadamente 1×10⁸ células de levadura, se lavaron dos veces con tampón PBSA y se resuspendieron en 1 ml de tampón PBSA que contenía B7H3-mFc biotinilada 10 µg/ml y un anticuerpo anti-c-myc de ratón (Jackson Research Laboratories, Bar Harbor, Maine). Después de la incubación, se

lavarón las células de levadura 3 veces y luego se resuspendieron en 1 ml de tampón PBSA. Se añadieron tanto una dilución 1:100 de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (BD Bioscience) como anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con FITC (Fab)₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las células de levadura que iban a clasificarse, después de lo cual se incubaron las células a 4°C durante 30 min, se lavaron 3 veces con tampón PBSA y luego se resuspendieron en tampón PBSA para la clasificación. Se determinaron las puertas de clasificación para seleccionar señales de unión a antígeno superiores. Las células recogidas se hicieron crecer durante la noche en medio SDCAA a 30°C y luego se incubaron en SG/RCAA para la siguiente tanda de clasificación. Para las siguientes dos selecciones, se usaron aproximadamente 1-2×10⁷ células de levadura para teñir con 3 µg/ml y 1 µg/ml de B7H3 biotinilada, respectivamente. Se aislaron plásmidos de levadura usando el kit Zymoprep Yeast Plasmid Mimiprep II (Zymo Research, Irvine, CA) según las instrucciones del fabricante y se usaron como moldes para la construcción de la segunda biblioteca. La construcción y la selección de la segunda biblioteca se realizaron como con respecto a la primera biblioteca de levadura. Sin embargo, la segunda biblioteca de levadura se sometió a cuatro selecciones FACS con 1, 0,2, 0,05 y 0,01 µg/ml de B7H3-mFc biotinilada, respectivamente. Las células de la última selección se extendieron en placas de SDCAA. Se caracterizaron células de levadura monoclonales y se secuenciaron plásmidos aislados que codificaban para scFv con afinidad mejorada.

Expresión y purificación de scFv soluble

Se expresaron y purificaron scFv tal como se describió previamente (Zhao *et al.*, 2011, Mol. Cancer Ther. 10: 1677-1685). Se transformaron células bacterianas HB2151 con el plásmido pComb3x que contenía secuencias de scFv. Se inocularon colonias recientes individuales en medio 2YT que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 0,2%. Se indujo el cultivo mediante isopropil-L-tio-h-D-galactopiranosido (concentración final de 0,5 mM). Después de un crecimiento durante la noche a 30°C, se centrifugaron las bacterias a 5.000xg durante 15 min. Se liberó scFv soluble a partir del periplasma bacteriano incubando las bacterias a 30°C durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante transparente y se purificó en una columna de Ni-NTA. Todos los scFv recombinantes tenían etiquetas FLAG e His.

Expresión y purificación de constructos de IgG

Los constructos génicos (basados en el vector pBluescript (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)) que codifican para la cadena pesada y ligera de 8H9 se transfectaron en células CHO-S y se seleccionaron con G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cultivaron líneas productoras de anticuerpos en medio libre de suero OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y luego se recogió el sobrenadante. Se equilibró previamente una columna de afinidad de proteína A con tampón de citrato de sodio 25 mM/NaCl 0,15 M a pH 8,2. Se eluyó 8H9 unido con tampón ácido cítrico/citrato de sodio 0,1 M, pH 3,9 y se dializó en citrato de sodio 25 mM y NaCl 150 mM a pH 8,2.

ELISA

Se recubrieron B7H3-mFc (100 ng/pocillo) o 2IgB7H3 (R&D, Minneapolis, MN) (25 ng/pocillo) sobre placas de microtitulación de polivinilo en PBS durante la noche. A continuación, se bloquearon las placas con BSA al 0,5% en PBS a 150 µl por pocillo durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron anticuerpos por triplicado con dilución en serie en BSA al 0,5%. Tras la incubación durante 1 h a temperatura ambiente y el lavado con PBS, se añadió anticuerpo anti-Fc humano de ratón-HRP, estreptavidina-HRP o anticuerpo anti-Flag de ratón-HRP. Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente y el lavado adicional, se reveló el color y se cuantificó usando un lector de placas ELISA a 490 nm.

Análisis por citometría de flujo

Para la tinción de células de levadura que muestran scFv en su superficie, las células se incubaron con antígeno B7H3-mFc a diferentes concentraciones (0,1 y 1 µg/ml) en PBSA durante 30 min en hielo, seguido por incubación con un anticuerpo anti-ratón conjugado con APC (BD Bioscience, San Jose, CA) como anticuerpo secundario. Para la tinción de células tumorales, se recogieron las células en medio de cultivo y se incubaron con scFv purificados 1 µg/ml, seguido por incubación secuencial con un anticuerpo anti-his de ratón y un anticuerpo anti-ratón-PE. Se realizó citometría de flujo usando FACScalibur™ (BD Bioscience, San José, CA).

Determinación de la afinidad mediante resonancia de plasmón superficial

En resumen, el antígeno B7H3 (ya sea 2Ig-B7H3, 4Ig-B7H3, 2Ig-B7H3-mFc, 4Ig-B7H3-mFc), se inmovilizó directamente en el chip sensor CM5 mediante interacción hidrófoba. La superficie de referencia se configuró para cambios del índice de refracción y unión no específica. Para el análisis de la cinética de las interacciones, se inyectaron concentraciones variables de scFv a una velocidad de flujo de 30 µl/min usando tampón de corrida que contenía HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P-20 al 0,05% (pH 7,4). Los datos de la fase de asociación y disociación se ajustaron simultáneamente a un modelo 1:1 usando BIAevaluation 3.2. Todos los experimentos se realizaron a 25°C. Para la determinación de epítipo, se inmovilizaron 2Ig-B7H3 WT, R127A y D128A en el chip, se inyectaron 400 nM de ch8H9, MIH42, 6A1 y clon 185504 tal como se describió anteriormente (tiempo de contacto 180 s, tiempo de disociación 600 s).

Ensayo de proliferación de células T

Se purificaron células T a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas usando un kit de aislamiento de células T Pan (Miltenyi Biotec, Cambridge, MA). Se irradiaron células de neuroblastoma IMR-32 a 80 Gy y se resuspendieron en RPMI (GIBCO) a 0,1 millones/ml. Se añadieron 1×10^4 células IMR-32/pocillo (100 μ l) con diferentes concentraciones de ch8H9 (50 μ l) a una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron 2×10^5 células T purificadas/pocillo con 1,5 μ l de Dynabeads CD3/CD28 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a los pocillos con las células IMR-32. Se cultivaron las células y mantuvieron en RPMI suplementado con FBS e IL-2 30 U/ml a 37°C durante 6 días. Se cuantificó la proliferación de células T usando el ensayo Cell count Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Mol, Rockville, MD) según el protocolo del fabricante.

Ensayo de citotoxicidad mediada por células T

Las células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa) HER2(+) y B7H3(+) se cultivaron a 37°C con RPMI + FBS al 10%, L-glutamina al 2% y P/S al 1%. Se recogieron las células con tripsina/EDTA y se incubaron 1×10^6 células con 100 mCi de ^{51}Cr durante 60 min a 37°C y con o sin 100 mg/ml del anticuerpo de ratón específico para B7H3 8H9. Después de la incubación, se lavaron las células dos veces y se sembraron 5.000 células diana en cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos junto con células T a una razón de 1:10, respectivamente. A continuación se añadieron diferentes concentraciones (desde 1 hasta 1×10^{-6} 1 mg/ml) de un anticuerpo biespecífico anti-HER2 x anti-CD3 (trastuzumab fusionado con scFv de huOKT3) y luego se añadieron 10 mg/ml de anticuerpo 8H9 murino (este último sólo a células incubadas previamente con el anticuerpo 8H9). Se recogieron los sobrenadantes después de cuatro horas de incubación y se midió su radiactividad en un contador de centelleo. La lisis específica de las células tumorales se calculó basándose en la siguiente fórmula: % de lisis específica = (cpm de muestra - cpm espontáneos)/(cpm máximos - cpm espontáneos) $\times$ 100%.

Cultivo de células tumorales y ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se obtuvieron células tumorales de neuroblastoma LAN-1 del Hospital infantil de Los Ángeles. Se cultivaron las células en RPMI1640 (Cellgro, Manassas, VA) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS, Life Technologies, Grand Island, NY) a 37°C en una incubadora humidificada con el 5% de CO_2 . Se realizaron ensayos de ADCC tal como se describió anteriormente (Cheung, N.K. *et al.*, 2012, *Oncimmunology* 1: 477-48652). En resumen, se radiomarcaron células tumorales de neuroblastoma LAN-1 con ^{51}Cr , y se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como efectores a una razón de efector con respecto a diana de 25:1. La citotoxicidad se midió mediante liberación de ^{51}Cr .

Biodistribución de anticuerpo en ratones con xenoinjertos

Se adquirieron ratones desnudos atímicos hembras (6-8 semanas de edad) de Harlan Sprague Dawley, Inc. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Memorial Sloan Kettering Cancer Center y las directrices institucionales para el uso adecuado y humanitario de animales en la investigación. Se recogieron células tumorales (LAN-1) y se implantaron por vía subcutánea (s.c.) en el costado de los ratones (5×10^6 células por cada ratón). Cuando los volúmenes tumorales fueron de aproximadamente 200 mm³, a grupos aleatorizados de ratones (n = 4-5/grupo, una preparación de anticuerpo radiomarcado/grupo) se les inyectaron por vía intravenosa 50 μ Ci de anticuerpo radioyodado con ^{131}I (preparado según el método IODO-GEN (Salacinski, P.R. *et al.*, 1981, *Analytical biochemistry* 117: 136-146; Harlow, E. y D. Lane, 1999, *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) seguido por purificación por filtración en gel usando columnas comerciales Sephadex G-25 preempaquetadas en PBS + BSA al 1%; actividad específica: 1,67-3,81 mCi/mg; 13-30 μ g de anticuerpo/dosis). La inmunorreactividad de cada trazador se evaluó usando un ensayo de unión celular *in vitro* con LAN-1 recién recogidas. Se sacrificaron los ratones 48 horas tras la inyección (p.i.), se extirparon los órganos y se sometieron a recuento en un contador gamma (Perkin Elmer Wallac Wizard 3). Estos órganos incluyeron piel, hígado, bazo, riñón, glándula suprarrenal, estómago, intestino delgado, intestino grueso, fémur, músculo, tumor, corazón, pulmón, médula espinal y cerebro. Se corrigieron las tasas de recuento con respecto al fondo y la descomposición, se convirtieron en actividades usando un factor de calibración del sistema específico para el isótopo, se normalizaron hasta el canal espinal y sobre las convexidades corticales, un estado denominado carcinomatosis leptomeníngea (LM) (Grossman, S.A. *et al.*, 1999, *Oncology* 13: 144-152; Bruno, M.K. *et al.*, 2005, *Cancer Treat. Res.* 125: 31-52; Gleissner, B. *et al.*, 2006, *Lancet Neurol.* 5: 443-52). También se calcularon las razones de tumor con respecto a no tumor del % de DI/g.

Uso clínico de 8H9 en radioinmunoterapia compartimental

Metástasis al sistema nervioso central (SNC)

La metástasis cerebral es una complicación devastadora y un obstáculo importante para la cura del cáncer para la mayoría de tumores sólidos; su biología apenas se comprende, el manejo es inadecuado y la curación es rara (Maher EA *et al.*, *Cancer Res* 69: 6015-20, 2009). Las células tumorales de las metástasis cerebrales y de sangre pueden invadir el LCR y diseminarse a través del neuroeje mediante el flujo constante de LCR desde los ventrículos hasta el canal espinal y sobre las convexidades corticales, un estado denominado carcinomatosis leptomeníngea (LM) (Grossman, S.A. *et al.*, 1999, *Oncology* 13: 144-152; Bruno, M.K. *et al.*, 2005, *Cancer Treat. Res.* 125: 31-52; Gleissner, B. *et al.*, 2006, *Lancet Neurol.* 5: 443-52).

La carcinomatosis LM es más común en pacientes con metástasis sistémica diseminada (Wasserstrom, W.R. *et al.*, 1982, Cancer 49: 759-72; Balm, M. *et al.*, 1996, Arch. Neurol. 53: 626-32; Chamberlain, M.C. *et al.*, 2005, J. Clin. Oncol. 23: 3605-13). Las metástasis cerebrales parenquimatosas concurrentes no son infrecuentes (11%-31% de los pacientes) (Wasserstrom, W.R. *et al.*, 1982, Cancer 49: 759-72; Freilich, R.J. *et al.*, 1995, Annals of Neurology 38: 51-57; Posner, J.B., Neurologic Complications of Cancer, Contemporary Neurology Series, Filadelfia, F.A. Davis Company, 1995). A diferencia de la leucemia, donde la metástasis de LM se controla bien mediante quimioterapia intratecal (Littman, P. *et al.*, 1987, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 13: 1443-9), el pronóstico con respecto a los tumores sólidos es extremadamente reservado a pesar del uso de quimioterapia y radioterapia (Wasserstrom, W.R. *et al.*, 1982, Cancer 49: 759-72; Grossman, S.A. *et al.*, 1991, Neurol. Clin. 9: 843-56).

10 *Ascitis maligna*

La ascitis maligna (carcinomatosis peritoneal) acompaña a un amplio espectro de tumores abdominales y extraabdominales. La obstrucción linfática y la permeabilidad vascular son factores principales en su patogénesis (Holm-Nielsen, P., 1953, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 33: 10-21; Sangisetty, S.L. *et al.*, 2012, World J. Gastrointest. Surg. 4: 87-95). La ascitis maligna reduce significativamente la calidad de vida de los pacientes dado que da como resultado pérdida de proteínas, desequilibrio electrolítico, edema difuso y septicemia abdominal. Entre los tumores abdominales, los tumores malignos de ovario, endometrio, colorrectales, gástricos, pancreáticos y peritoneales están asociados con ascitis maligna. En algunos estudios, hasta el 15% de todos los pacientes con cánceres gastrointestinales desarrollan ascitis maligna en algún estadio de su enfermedad (Smith, E.M. *et al.*, 2003, Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.) 15: 59-72; Koppe, M.J. *et al.*, 2006, Ann. Surg. 243: 212-22). Aunque el cáncer de ovario epitelial representa el 25% (22.240 casos nuevos, 14.030 muertes al año en los EE.UU.), de todos los cánceres del aparato genital femenino, dos tercios de estos pacientes desarrollan ascitis maligna (Eskander, R.N. *et al.*, 2012, Int. J. Womens Health 4: 395-404).

También se sabe que los tumores extraabdominales, por ejemplo, cáncer de mama, cánceres de pulmón y linfoma, provocan ascitis maligna. En hasta el 20% de todos los pacientes con ascitis maligna, se desconoce el sitio de tumor primario (Saif, M.W. *et al.*, 2009, Ann. Saudi Med. 29: 369-77).

Según el estudio multicéntrico de evolución de carcinomatosis peritoneal (EVOCAPE), la ascitis maligna es un factor de pronóstico adverso que da como resultado una mediana de supervivencia de unos pocos meses (Sadeghi, B. *et al.*, 2000, Cancer 88: 358-63). No existen terapias curativas, mientras que los tratamientos paliativos son inadecuados y a menudo conducen a una muerte dolorosa (Sangisetty, S.L. *et al.*, 2012, World J. Gastrointest. Surg. 4: 87-95; Sugarbaker, P.H. *et al.*, 2006, Ann. Surg. Oncol. 13: 635-44).

30 *Experiencia previa con radioinmunoterapia compartimental (cRIT)*

Un enfoque para la ascitis maligna y la carcinomatosis LM es la radioinmunoterapia compartimental (cRIT), en la que se inyectan anticuerpos radiomarcados directamente en el compartimento (cavidad peritoneal o espacio del LCR) para dirigir la radiación a los tumores. Pacientes con cáncer de ovario recurrente toleraron la administración intraperitoneal de anticuerpo ⁹⁰Y-CC49 (anticuerpo anti-TAG-72 de ratón, ≤24 mCi/m²) (Álvarez, R.D. *et al.*, 2002, Clin. Cancer Res. 8: 2806-11) y anticuerpo ⁹⁰Y-HMFG1 (anticuerpo anti-MUC1 de ratón, 666 MBq/m²) (Verheijen, R.H. *et al.*, 2006, J. Clin. Oncol. 24: 571-8), aunque el estudio no mostró ninguna evidencia de aumento de la supervivencia. La administración intratecal e intraventricular para el tratamiento de carcinomatosis LM y terapia intratumoral de tumores cerebrales malignos usando anticuerpos ¹³¹I-81C6 (AcM anti-tenascina) prolongó la supervivencia del paciente (Reardon *et al.*, 2006, J. Clin. Oncol. 24: 115-22; Reardon, D.A. *et al.*, 2008, Neuro. Oncol. 10: 182-9). El uso del anticuerpo At-81C6 es un ejemplo de terapia con partículas α para la enfermedad residual mínima en el glioma maligno (Zalutsky, M.R. *et al.*, 2008, J. Nucl. Med. 49: 30-8).

El compartimento del LCR es adecuado de manera ideal para que cRIT logre un índice terapéutico altamente favorable

El espacio del LCR (saco tecal) tiene características únicas adecuadas para cRIT: (1) la barrera hematoencefálica (BHE) evita la recirculación de AcM; (2) en comparación con la sangre, el LCR tiene pocos glóbulos blancos y, por tanto, ningún FcR (N) y ~1000 veces menos IgG (Davson, H., Segal MB: Physiology of the CSF and blood-brain barriers. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, págs. 489-523). (3) El AcM inyectado en el compartimento del LCR está mejor protegido frente a la inmunidad del huésped, con menos secuestro por receptores de Fc o degradación por enzimas; (4) el contenido de proteína 200 veces menor del LCR (frente al suero) facilita la unión de AcM a su diana prevista; (5) dado que el volumen de LCR es pequeño (140 ml), el AcM alcanza una concentración compartimental muy alta; (6) el compartimento del LCR se renueva cada 7-8 horas, proporcionando una etapa de lavado incorporada; (7) el flujo de LCR puede reducirse farmacológicamente, lo que permite un tiempo de reacción de AcM más prolongado; (8) la aparente ausencia de una barrera anatómica facilita el movimiento de AcM entre el LCR y el espacio extracelular del cerebro (Davson H, Segal MB: Physiology of the CSF and blood-brain barriers. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, págs. 489-523; Spector, R., Mock D.M., 1988, Neurochem. Res. 13: 213-9) especialmente si hay daño en las meninges por tumor o por cirugía.

Metástasis de neuroblastoma al SNC

Hace tiempo se consideraba que la metástasis del neuroblastoma al SNC era común. En un análisis retrospectivo de 61 pacientes con neuroblastoma metastásico al SNC en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center durante la última década, 34 pacientes con NB del SNC (sin evidencia de enfermedad ósea en el cráneo) tenían enfermedad amplificada de *MYCN*, mientras que 9 tenían una punción lumbar en el diagnóstico inicial, siendo ambos factores de riesgo conocidos (Kramer, K. *et al.*, 2001, Cancer 91: 1510-9). Dos pacientes tenían enfermedad del SNC en la presentación inicial del NB, ambos con cefaleas y presión intracraneal alta que requirió derivaciones. 57 pacientes tenían NB del SNC a los 5-61 meses (mediana de 21,7) desde el diagnóstico, mediana de 18,5 meses en la cohorte amplificada de *MYCN*. Cuarenta pacientes (68%) tuvieron recidiva aislada del SNC, incluyendo 26 (44%) con un sólo foco parenquimatoso. Se produjo diseminación leptomeningea en 19 (32%) pacientes, teniendo el resto enfermedad multifocal. A medida que ha cambiado la historia natural del NB, la recidiva aislada del SNC ha hecho que la curación sea difícil de alcanzar, y ahora afecta a más del 20% de los pacientes del MSKCC cuya enfermedad sistémica se ha "erradicado" (Cheung, N.K. *et al.*, 2012, J. Clin. Oncol. 30: 3264-70). Las modalidades de tratamiento convencionales, incluyendo resección quirúrgica, quimioterapia y radiación, no han mejorado el desenlace del paciente (Causa, L. *et al.*, 2010, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 79 (1): 214-9; Croog, V.J. *et al.*, 2010, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 78 (3): 849-54).

cRIT de cáncer metastásico al sistema nervioso central en un estudio en fase III usando Intra-Ommaya^{131I}-8H9

El primer anticuerpo monoclonal ^{131I} en uso en seres humanos se sometió satisfactoriamente a prueba en un ensayo clínico en fase I con un perfil de toxicidad y un desenlace de paciente favorables (Kramer, K. *et al.*, 2007, J. Clin. Oncol. 25: 5465-70). Usando esta plataforma, se sometió a prueba ^{131I}-8H9 en un estudio en fase I/II. Los pacientes se estudiaron con SPECT (tomografía computarizada por emisión monofotónica) después de recibir 2 mCi de ^{131I}-8H9 o PET (tomografía por emisión de positrones) después de recibir ^{124I}-8H9 inyectado a través de un depósito Ommaya. Se tomaron muestras en serie de LCR y sangre durante 48 horas para cálculos de dosimetría. Se obtuvieron exploraciones SPECT o PET aproximadamente a las 4, 24 y 48 horas. Se obtuvieron RM de cerebro y médula espinal así como citología de LCR antes y 4 semanas después de la inyección. Se administró una segunda inyección de ^{131I}-8H9 a menos que los pacientes desarrollaran una enfermedad progresiva. Los efectos secundarios agudos incluyeron fiebre de grado 1 o 2, cefalea o vómitos y elevación ocasional transitoria de ALT de grado 3. La dosis media de radiación calculada en el LCR fue de 36,3 (intervalo de 12,8-106) cGy/mCi; la dosis media en sangre fue de 2,5 cGy/mCi. ^{124I}-8H9/PET proporcionó imágenes de alta resolución de la distribución del fármaco dentro del espacio del LCR y se correlacionó bien con la dosis prevista administrada mediante terapia con ^{131I}-8H9. Se observó una respuesta radiográfica de la enfermedad de LM; los efectos secundarios agudos fueron limitados. Intra-Ommaya ^{131I}-8H9 parece ser relativamente seguro, tiene una razón terapéutica favorable y, aparte de la toxicidad medular, aún no se ha alcanzado la DMT (80 mCi por dosis).

*Supervivencia prolongada para pacientes con neuroblastoma del SNC (Kramer K *et al.*, J Neurooncol 97: 409-18, 2010; Kramer K *et al.*, Advances in Neuroblastoma Research A-0241, 2014)*

Se sometieron pacientes del Memorial Sloan Kettering Cancer Center a un régimen de rescate del SNC basado en temozolamida/irinotecán que incorporaba cRIT usando ^{131I}-8H9 (n = 37) y ^{131I}-3F8 (n = 5), más inmunoterapia sistémica con 3F8 + GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) (Gp1). Los tratamientos que no eran del régimen usaron otras terapias +/-cRIT (Gp2, todos ^{131I}-8H9). La evaluación de la enfermedad incluyó RM de cerebro/médula espinal en serie, MIBG, TC y médula ósea. De 83 pacientes con NB del SNC, cRIT fue posible en 56 (67%), 42 (51%) tras el régimen de rescate (Gp1), presentando el 33% múltiples masas parenquimatosas +/- enfermedad leptomeningea. En Gp1, 26/42 (62%) pacientes están vivos y bien, supervivencia global media (SG) de 82,6 meses, incluyendo 5/14 (35%) con enfermedad leptomeningea o masas parenquimatosas múltiples; 3/42 (7%) muertes se debieron a complicaciones distintas de NB. La SG para los pacientes con Gp2 fue del 15% (media de 21 meses). Los únicos supervivientes a largo plazo entre los pacientes con Gp2 incluyeron 7 que recibieron cRIT (SG media de 42,8 meses). En conjunto, 47 pacientes (56%) murieron de NB que afectaba sólo al SNC (n = 12, 25%), sólo sistémico (n = 14, 30%), SNC y sistémico (n = 16, 34%) o toxicidad (n = 5, 11%). La toxicidad relacionada con el tratamiento incluyó hemorragia del SNC (1) e insuficiencia pulmonar durante la quimioterapia (1). Las muertes en los supervivientes a largo plazo incluyeron infección (1), fibrosis pulmonar (1) y LMA (1). La radionecrosis fue poco común. (Kramer, K. *et al.*, 2014, Advances in Neuroblastoma Research A-0246). Esta es una mejora significativa en la supervivencia para pacientes tratados con cRIT en su primera recidiva en el SNC. El régimen con cRIT se toleró bien por pacientes jóvenes, a pesar de su historial previo de terapias citotóxicas intensivas. Tiene el potencial de aumentar la supervivencia con una calidad de vida mejor de lo esperado.

*cRIT intraperitoneal (i.p.) con ^{131I}-8H9 (Modak, MJ *et al.*, ASCO Annual Meeting, J Clin Oncol 2013)*

Un estudio en fase I de cRIT intraperitoneal (i.p.) con ^{131I}-8H9 para pacientes con tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas (DSRCT) y otros tumores sólidos que implican el peritoneo está casi completado en niños y adultos jóvenes (clinicaltrials.gov NCT01099644). El DSRCT, un sarcoma poco común de adolescentes y adultos jóvenes que suele aparecer en el peritoneo, es letal en >80% de los pacientes a pesar de la terapia multimodal agresiva. A menudo se presentan recidivas como implantes peritoneales multifocales, lo que lo hace especialmente adecuado para la selección como diana i.p. cRIT i.p., gracias a un tiempo de residencia prolongado y una transferencia lenta/incompleta a la circulación, puede seleccionar como diana selectivamente la enfermedad i.p. mientras minimiza la toxicidad orgánica. En este estudio, se trataron cohortes de 3-6 pacientes con ^{131I}-8H9 a dosis

escalonadas de desde 30 mCi/m² hasta 60 mCi/m² como una sola inyección i.p. Una dosis de trazador de 2 mCi de ¹²⁴I-8H9 se administró por vía i.p. antes de ¹³¹I-8H9 para adquirir imágenes PET y datos de biodistribución. Se estudió la farmacocinética (PK) mediante extracciones de sangre en serie. Se trataron 15 pacientes que habían recibido mucho tratamiento previo (de los cuales 13 tenían DSRCT y 2 tenían rabdomiosarcoma) recibieron ¹³¹I-8H9 30, 40, 50 mCi/m² (3 en cada nivel de dosis) o 60 mCi/m² (n = 6). No se observó toxicidad limitante de la dosis. En 3 pacientes se observaron tres toxicidades de grado 3 separadas transitorias, autolimitativas y posiblemente relacionadas con la terapia, neutropenia, elevación de las transaminasas hepáticas y trombocitopenia, respectivamente. Ningún paciente requirió rescate de células madre hematopoyéticas. La semivida en sangre fue de 32,5 ± 11,5 h (n = 12) y el tiempo medio de residencia peritoneal fue de 14,6 h (n = 3). La dosis media absorbida en sangre basándose en la toma de muestras de sangre fue de 0,56 ± 0,21 rad/mCi (n = 14). Las dosis medias absorbidas (rad/mCi) en riñón, hígado, pulmón y bazo fueron de 1,72, 1,92, 0,64 y 1,03, respectivamente (n = 3). La deshalogenación fue insignificante: >80% del yodo permaneció unido a proteínas en sangre (n = 10). 6/7 pacientes con DSRCT tratados sin enfermedad evaluable permanecen en remisión a una mediana de 11,1 meses después de ¹³¹I-8H9. cRIT que usa ¹³¹I-8H9 i.p. fue seguro y ¹²⁴I-8H9 proporcionó valiosos datos de PK y dosimetría. Dado que no se alcanzó la dosis máxima tolerada, se expandió la acumulación de pacientes para tratar hasta 90 mCi/m².

Administración potenciada por convección (CED, "convection enhanced delivery") de ¹²⁴I-8H9 para pacientes con gliomas pontinos difusos no progresivos tratados previamente con radioterapia de haz externo (Clinicaltrials.gov NCT01502917)

El glioma pontino difuso (DPG) en la infancia es un estado uniformemente mortal con una mediana de esperanza de vida de sólo 8-10 meses desde el diagnóstico. (Dunkel, I.J. *et al.*, 1998, J. Neurooncol. 37: 67-73; Kaplan, A.M *et al.*, 1996, Pediatr. Neurosurg. 24: 185-92). A pesar de ensayos clínicos innovadores, incluyendo radioterapia hiperfraccionada y quimioterapia de dosis alta, la supervivencia de los pacientes con DPG no ha cambiado. La CED, también denominada infusión intersticial, es un modo de administración local de fármacos que se basa en un gradiente dependiente de la presión para potenciar una dispersión uniforme de la infusión y el volumen de distribución. (Laske, D.W. *et al.*, 1997, J. Neurosurg. 87: 586-94; Morrison, P.F. *et al.*, 1994, Am. J. Physiol. 266: R292-305). Se coloca de manera estereotáctica una cánula de pequeño calibre en el parénquima o el tumor y se administra la infusión a una tasa constante lenta. Esto evita la BHE, que supone un obstáculo natural para la alta concentración regional y distribución de productos terapéuticos administrados sistémicamente en el cerebro. En el caso de DPG, en el que la BHE está en gran parte intacta, las terapias contra el cáncer administradas por vía oral o sistémica tienen una penetrancia limitada en el SNC. Estudios preclínicos han demostrado que la CED de 8H9 en el tronco encefálico de roedores era segura. (Luther, N. *et al.*, 2008, Neurosurgery 63: 1166-74; Occhiogrosso, G. *et al.*, 2003, Neurosurgery 52: 388-94; Luther, N. *et al.*, 2014, Neuro. Oncol., en prensa). Además, también se encontró que la CED intratumoral de 8H9 (Luther, N. *et al.*, 2008, Neurosurgery 63: 1166-74) o su inmunotoxina (8H9-exotoxina de pseudomonas) (Luther, N. *et al.*, 2010, Mol. Cancer. Ther. 9: 1039-46) en xenoinjertos de U87 inmunorreactivos en cerebro de rata era segura, con una distribución similar a la que se encontró en el cerebro sin tratamiento previo. Finalmente, ¹²⁴I-8H9 se toleró bien en el tronco encefálico de roedores así como de primates tras infusión intersticial (Luther, N. *et al.*, 2014, Neuro. Oncol.: en prensa). Al aumentar o bien la dosis o bien el volumen de la infusión de anticuerpos, puede aumentarse el volumen de distribución de 8H9. ¹²⁴I-8H9 es un agente teranóstico ideal para dosimetría y terapia. En el ensayo clínico en fase I, pacientes con DIPG que se sometieron a radioterapia de haz externo como parte de las normas asistenciales recibieron CED de ¹²⁴I-8H9 a 4 niveles de dosis (0,25, 0,5, 0,75 y 1 mCi/inyección) con 3-6 pacientes en cada grupo. A 1 mCi/inyección, no se ha alcanzado la DMT. Mediante PET, ¹²⁴I-8H9 mostró una exquisita localización del tumor. No hubo complicaciones a partir de la CED y no se observaron toxicidades significativas (> grado 2). Los pacientes tratados a los niveles de dosis de ¹²⁴I-8H9 más altos han sobrevivido más allá de la mediana histórica de tiempo hasta la muerte. El ensayo está modificándose para continuar ajustando a escala la dosis con 3 niveles de dosis adicionales (2,5, 3,5 y 4 mCi). La CED de 8H9 radiomarcado puede aplicarse a otros tumores cerebrales infiltrativos primarios o metastásicos solitarios.

Equivalentes y alcance

En las reivindicaciones, artículos tales como "un", "una" y "el/la" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo por el contexto. Se considera que las afirmaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se satisfacen si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se empujan en o son relevantes de otro modo para un producto o procedimiento dado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea en o es de otro modo relevante para un producto o procedimiento dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se empujan en o son de otro modo relevantes para un producto o procedimiento dado.

Se indica que se pretende que el término "que comprende" sea abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

Cuando se proporcionan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo por el contexto y la comprensión de un experto habitual en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos mencionados en diferentes realizaciones de la invención, hasta la décima parte de la unidad del

límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Las publicaciones comentadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo contenido en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de una divulgación previa.

5

Bibliografía

Mellman I, Coukos G, Dranoff G: Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-9, 2011

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM: Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24:207-12, 2012

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, *et al*: Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, *et al*: Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012

Romagne F, Andre P, Spee P, *et al*: Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114:2667-77, 2009

Godal R, Bachanova V, Gleason M, *et al*: Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biol. Blood Marrow Transplant* 16:612-21, 2010

Tarek N, Gallagher MM, Zheng J, *et al*: Unlicensed natural killer cells dominate neuroblastoma killing in the presence of anti-GD2 monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* (en prensa), 2012

Zhao XW, van Beek EM, Schornagel K, *et al*: CD47-signal regulatory protein-alpha (SIRPalpha) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:18342-7, 2011

Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, *et al*: CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-99, 2009

Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, *et al*: Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 71:1374-84, 2011

Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, *et al*: Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2:63ra94, 2010

Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, *et al*: Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142:699-713, 2010

Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, *et al*: The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:6662-6667, 2012

Wilcox RA, Ansell SM, Lim MS, *et al*: The B7 Homologues and their Receptors in Hematologic Malignancies. *Eur. J. Haematol.*, 2012

Chapoval AI, Ni J, Lau JS, *et al*: B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2:269-74, 2001

Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, *et al*: Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J. Immunol.* 172:2352-9, 2004

Sun M, Richards S, Prasad DV, *et al*: Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J. Immunol.* 168:6294-7, 2002

Suh WK, Gajewska BU, Okada H, *et al*: The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 4:899-906, 2003

Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, *et al*: Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:12640-5, 2004

Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, *et al*: B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res.* 67:7893-900, 2007

Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, *et al*: B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and

- associated with disease spread and poor outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:19458-63, 2007
- Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, *et al*: Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14:5150-7, 2008
- Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, *et al*: T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin. Cancer Res.* 14:4800-8, 2008
- Zang X, Sullivan PS, Soslow RA, *et al*: Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. *Mod. Pathol.* 23:1104-12, 2010
- Lemke D, Pfenning PN, Sahm F, *et al*: Costimulatory protein 4IgB7H3 drives the malignant phenotype of glioblastoma by mediating immune escape and invasiveness. *Clin. Cancer Res.* 18:105-17, 2012
- Wang L, Zhang Q, Chen W, *et al*: B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. *PLoS One* 8:e70689, 2013
- Yamato I, Sho M, Nomi T, *et al*: Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 101:1709-16, 2009
- Gregorio A, Corrias MV, Castriconi R, *et al*: Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule. *Histopathology* 53:73-80, 2008
- Sun X, Vale M, Leung E, *et al*: Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Ther.* 10:1728-34, 2003
- Wu CP, Jiang JT, Tan M, *et al*: Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis. *World J. Gastroenterol.* 12:457-9, 2006
- Loos M, Hedderich DM, Ottenhausen M, *et al*: Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. *BMC Cancer* 9:463, 2009
- Hofmeyer KA, Ray A, Zang X: The contrasting role of B7-H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10277-8, 2008
- Vigdorovich V, Ramagopal UA, Lazar-Molnar E, *et al*: Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure* 21:707-17, 2013
- Zhou Z, Luther N, Ibrahim GM, *et al*: B7-H3, a potential therapeutic target, is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* 111:257-64, 2013
- Calabro L, Sigalotti L, Fonsatti E, *et al*: Expression and regulation of B7-H3 immunoregulatory receptor, in human mesothelial and mesothelioma cells: immunotherapeutic implications. *J. Cell Physiol.* 226:2595-600, 2011
- Modak S, Kramer K, Gultekin SH, *et al*: Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res.* 61:4048-54, 2001
- Xu H, Cheung IY, Guo HF, *et al*: MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res.* 69:6275-81, 2009
- Modak S, Guo HF, Humm JL, *et al*: Radioimmunotargeting of human rhabdomyosarcoma using monoclonal antibody 8H9. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20:534-46, 2005
- Luther N, Cheung NK, Dunkel IJ, *et al*: Intraparenchymal and intratumoral interstitial infusion of anti-glioma monoclonal antibody 8H9. *Neurosurgery* 63:1166-74; discusión 1174, 2008
- Juhl H, Petrella EC, Cheung NK, *et al*: Additive cytotoxicity of different monoclonal antibody-cobra venom factor conjugates for human neuroblastoma cells. *Immunobiology* 197:444-59, 1997
- Onda M, Wang QC, Guo HF, *et al*: In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* 64:1419-24, 2004
- Luther N, Cheung NK, Souliopoulos EP, *et al*: Interstitial infusion of glioma-targeted recombinant immunotoxin 8H9scFv-PE38. *Mol. Cancer Ther.* 9:1039-46, 2010
- Cheung NK, Guo HF, Modak S, *et al*: Anti-idiotypic antibody facilitates scFv chimeric immune receptor gene transduction and clonal expansion of human lymphocytes for tumor therapy. *Hybrid Hybridomics* 22:209-18, 2003
- Kramer K, Modak S, Kushner BH, *et al*: Radioimmunotherapy of metastatic cancer to the central nervous system: Phase I study of intrathecal 131I-8H9. *American Association for Cancer Research LB-4 (presentación)*, 2007
- Kramer K, Kushner BH, Modak S, *et al*: Effective Intrathecal Radioimmunotherapy-Based Salvage Regimen for

Metastatic Central Nervous System (CNS) Neuroblastoma (NB). Presentado en el ISPNO 2008, 2008

Kramer K, Kushner BH, Modak S, *et al*: Compartmental intrathecal radio immunotherapy: results for treatment for metastatic CNS neuroblastoma. *J. Neurooncol.* 97:409-18, 2010

Loo D, Alderson RF, Chen FZ, *et al*: Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* 18:3834-45, 2012

Cheung NK, Guo H, Hu J, *et al*: Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibodydependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncolimmunology* 1:477-486, 2012

Zhao Q, Feng Y, Zhu Z, *et al*: Human monoclonal antibody fragments binding to insulin-like growth factors I and II with picomolar affinity. *Mol. Cancer Ther.* 10:1677-85, 2011

Cheung, I. Y., Farazi, T. A., Ostrovnya, I., *et al*: Deep MicroRNA sequencing reveals downregulation of miR-29a in neuroblastoma central nervous system metastasis. *Genes, chromosomes & cancer* 53:803-814, 2014

Chen, R., Li, L., y Weng, Z.: ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* 52, 80-87, 2003

Sanchez, R., y Sali, A.: Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins Sup.* 1:50-58, 1997

Rocchia, W., Sridharan, S., Nicholls, A. *et al*: Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: Applications to the molecular systems and geometric objects. *J. Comput. Chem.* 23:128-137, 2002

Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E. *et al*: Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solidphase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Analytical biochemistry* 117:136-146, 1981

Harlow, E., y Lane, D., 1999, *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Ahmed, M., Hu, J., y Cheung, N. K.: Structure Based Refinement of a Humanized Monoclonal Antibody That Targets Tumor Antigen Disialoganglioside GD2. *Frontiers in immunology* 5:372, 2014

Zhao, Q., Ahmed, M., Tassev, D. V. *et al*: Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential. *Leukemia*, 2015

Zhao, Q., Ahmed, M., Guo, H. F., Cheung, I. Y., y Cheung, N. K.: Alteration of Electrostatic Surface Potential Enhances Affinity and Tumor Killing Properties of Anti-ganglioside GD2 Monoclonal Antibody hu3F8. *J. Biol. Chem* 290:13017-13027, 2015

Lin, D. Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M. *et al*: The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:3011-3016, 2008

Lazar-Molnar, E., Yan, Q., Cao, E. *et al*: Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10483-10488, 2008

Stamper, C. C., Zhang, Y., Tobin, J. F. *et al*: Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 410:608-611, 2001

Schwartz, J. C., Zhang, X., Fedorov, A. A. *et al*: Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 410:604-608, 2001

Maher EA, Mietz J, Arteaga CL, *et al*: Brain metastasis: opportunities in basic and translational research. *Cancer Res.* 69:6015-20, 2009

Grossman SA, Spence A: NCCN clinical practice guidelines for carcinomatous/lymphomatous meningitis. *Oncology* 13:144-152, 1999

Bruno MK, Raizer J: Leptomeningeal metastases from solid tumors (meningeal carcinomatosis). *Cancer Treat. Res.* 125:31-52, 2005

Gleissner B, Chamberlain MC: Neoplastic meningitis. *Lancet Neurol.* 5:443-52, 2006

Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB: Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer* 49:759-72, 1982

Balm M, Hammack J: Leptomeningeal carcinomatosis. Presenting features and prognostic factors. *Arch. Neurol.*

53:626-32, 1996

Chamberlain MC: Neoplastic meningitis. *J. Clin. Oncol.* 23:3605-13, 2005

Freilich RJ, FRACP, Krol G, *et al*: Neuroimaging and Cerebrospinal Fluid Cytology in the Diagnosis of Leptomeningeal Metastasis. *Annals of Neurology* 38:51-57, 1995

Posner JB: Neurologic Complications of Cancer, Contemporary neurology series. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1995

Littman P, Coccia P, Bleyer WA, *et al*: Central nervous system (CNS) prophylaxis in children with low risk acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13:1443-9, 1987

Grossman SA, Moynihan TJ: Neoplastic meningitis. *Neurol. Clin.* 9:843-56, 1991

Holm-Nielsen P: Pathogenesis of ascites in peritoneal carcinomatosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 33:10-21, 1953

Sangisetty SL, Miner TJ: Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J. Gastrointest. Surg.* 4:87-95, 2012

Smith EM, Jayson GC: The current and future management of malignant ascites. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 15:59-72, 2003

Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, *et al*: Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann. Surg.* 243:212-22, 2006

Eskander RN, Tewari KS: Emerging treatment options for management of malignant ascites in patients with ovarian cancer. *Int. J. Womens Health* 4:395-404, 2012

Saif MW, Siddiqui IA, Sohail MA: Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Ann. Saudi Med.* 29:369-77, 2009

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, *et al*: Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 88:358-63, 2000

Sugarbaker PH, Alderman R, Edwards G, *et al*: Prospective morbidity and mortality assessment of cytoreductive surgery plus perioperative intraperitoneal chemotherapy to treat peritoneal dissemination of appendiceal mucinous malignancy. *Ann. Surg. Oncol.* 13:635-44, 2006

Alvarez RD, Huh WK, Khazaeli MB, *et al*: A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radio immunotherapy for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:2806-11, 2002

Verheijen RH, Massuger LF, Benigno BB, *et al*: Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission. *J. Clin. Oncol.* 24:571-8, 2006

Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, *et al*: Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J. Clin. Oncol.* 24:115-22, 2006

Reardon DA, Zalutsky MR, Akabani G, *et al*: A pilot study: 131I-antitenascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol.* 10:182-9, 2008

Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, *et al*: Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* 49:30-8, 2008

Davson H, Segal MB: Physiology of the CSF and blood-brain barriers. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, págs. 489-523

Spector R, Mock DM: Biotin transport and metabolism in the central nervous system. *Neurochem. Res.* 13:213-9, 1988

Kramer K, Kushner B, Heller G, *et al*: Neuroblastoma metastatic to the central nervous system. The Memorial SloanKettering Cancer Center Experience and A Literature Review. *Cancer* 91:1510-9, 2001

Cheung NK, Cheung IY, Kushner BH, *et al*: Murine Anti-GD2 Monoclonal Antibody 3F8 Combined With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and 13-Cis-Retinoic Acid in High-Risk Patients With Stage 4 Neuroblastoma in First Remission. *J. Clin. Oncol.* 30:3264-70, 2012

/

- Caussa L, Hijal T, Michon J, *et al*: Role of Palliative Radiotherapy in the Management of Metastatic Pediatric Neuroblastoma: A Retrospective Single-Institution Study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010
- Croog VJ, Kramer K, Cheung NK, *et al*: Whole Neuraxis Irradiation to Address Central Nervous System Relapse in High-Risk Neuroblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010
- Kramer K, Humm JL, Souweidane MM, *et al*: Phase I study of targeted radio immunotherapy for leptomeningeal cancers using intra-Ommaya 131-I-3F8. *J. Clin. Oncol.* 25:5465-70, 2007
- Kramer K, Kushner B, Modak S, *et al*: Recurrent Neuroblastoma Metastatic to the Central Nervous System: Is it curable? *Advances in Neuroblastoma Research 2014:A-0241*, 2014
- Kramer K, Kushner B, Modak S, *et al*: Radionecrosis in Children treated with Conventional Radiation Therapy and Intrathecal Radioimmunotherapy for CNS Neuroblastoma: Is it a Concern? *Advances in Neuroblastoma Research 2014:A-0246*, 2014
- Modak MJ, LaQuaglia M, Carrasquillo JA, *et al*: Intraperitoneal radio immunotherapy (RIT) for desmoplastic small round cell tumor (DSRCT): Initial results from a phase I trial (clinicaltrials.gov NCT01099644), ASCO Annual Meeting 2013, *J. Clin. Oncol.*, 2013
- Dunkel IJ, Garvin JH, Jr., Goldman S, *et al*: High dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue for children with diffuse pontine brain stem tumors. *Children's Cancer Group. J. Neurooncol.* 37:67-73, 1998
- Kaplan AM, Albright AL, Zimmerman RA, *et al*: Brainstem gliomas in children. A Children's Cancer Group review of 119 cases. *Pediatr. Neurosurg.* 24:185-92, 1996
- Laske DW, Morrison PF, Lieberman DM, *et al*: Chronic interstitial infusion of protein to primate brain: determination of drug distribution and clearance with single-photon emission computerized tomography imaging. *J. Neurosurg.* 87:586-94, 1997
- Morrison PF, Laske DW, Bobo H, *et al*: High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am. J. Physiol.* 266:R292-305, 1994
- Occhiogrosso G, Edgar MA, Sandberg DI, *et al*: Prolonged convection-enhanced delivery into the rat brainstem. *Neurosurgery* 52:388-93; discusión 393-4, 2003
- Luther N, Zhou Z, Zanzonico P, *et al*: The potential of theragnostic 124I-8H9 convection-enhanced delivery in diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol.*: en prensa, 2014
- Compte, M., Nunez-Prado, N., Sanz, L. y Alvarez-Vallina, L. Immunotherapeutic organoids: a new approach to cancer treatment. *Biomatter* 3, doi:10.4161/biom.23897 (2013).
- Noel, D. *et al*. In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells. *Hum. Gene Ther.* 8:1219-1229, doi:10.1089/hum.1997.8.10-1219 (1997).
- Noel, D. *et al*. High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 13:1483-1493, doi:10.1089/10430340260185111 (2002).
- Jooss, K. y Chirmule, N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 10:955-963, doi:10.1038/sj.gt.3302037 (2003).
- Xiao, P. J., Lentz, T. B. y Samulski, R. J. Recombinant adeno-associated virus: clinical application and development as a gene-therapy vector. *Therapeutic delivery* 3:835-856 (2012).
- Nathwani, A. C. *et al*. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365:2357-2365, doi:10.1056/NEJMoa1108046 (2011).
- Patel, N., Reiss, U., Davidoff, A. M. y Nathwani, A. C. Progress towards gene therapy for haemophilia B. *International journal of hematology* 99:372-376, doi:10.1007/s12185-014-1523-0 (2014).
- Fang, J. *et al*. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.* 23:584-590 (2005).
- Watanabe, M., Boyer, J. L. y Crystal, R. G. Genetic delivery of bevacizumab to suppress vascular endothelial growth factor-induced high-permeability pulmonary edema. *Hum. Gene Ther.* 20:598-610, doi:10.1089/hum.2008.169 (2009).
- Ho, D. T. *et al*. Growth inhibition of an established A431 xenograft tumor by a full-length anti-EGFR antibody following gene delivery by AAV. *Cancer Gene Ther.* 16:184-194, doi:10.1038/cgt.2008.68 (2009).

Wang, G. *et al.* Persistent expression of biologically active anti-HER2 antibody by AAVrh.10-mediated gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 17:559-570, doi:10.1038/cgt.2010.11 (2010).

Vigna, E. *et al.* "Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. *Cancer Res.* 68:9176-9183, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1688 (2008).

Balazs, A. B. *et al.* Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 481:81-84, doi:10.1038/nature10660 (2012).

Arafat, W. O. *et al.* Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv. *Gene Ther.* 9:256-262, doi:10.1038/sj.gt.3301639 (2002).

Sanz, L., Kristensen, P., Russell, S. J., Ramirez Garcia, J. R. y Alvarez-Vallina, L. Generation and characterization of recombinant human antibodies specific for native laminin epitopes: potential application in cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 50:557-565 (2001).

Sanz, L. *et al.* A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis. *Embo J.* 22:1508-1517, doi:10.1093/emboj/cdg150 (2003).

Sanz, L. *et al.* Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther.* 9:1049-1053, doi:10.1038/sj.gt.3301725 (2002).

Sanchez-Arevalo Lobo, V. J. *et al.* Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int. J. Cancer* 119:455-462, doi:10.1002/ijc.21851 (2006).

Afanasieva, T. A. *et al.* Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther.* 10:1850-1859, doi:10.1038/sj.gt.3302085 (2003).

Liu, X., Wu, J., Zhang, S., Li, C. y Huang, Q. Novel strategies to augment genetically delivered immunotoxin molecular therapy for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 16:861-872, doi:10.1038/cgt.2009.30 (2009).

Blanco, B., Holliger, P., Vile, R. G. y Alvarez-Vallina, L. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J. Immunol.* 171:1070-1077 (2003).

Compte, M. *et al.* Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther.* 14: 380-388, doi:10.1038/sj.cgt.7701021 (2007).

Lista de secuencias

<110> CENTRO ONCOLÓGICO MEMORIAL SLOAN KETTERING

<120> ANTICUERPOS, COMPOSICIONES Y USOS

<130> 2003080-0937

<140>

<141>

<150> 62/042.457

<151> 27-08-2014

<160> 105

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 838 750 T3

<400> 1

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 2

ES 2 838 750 T3

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 3

ES 2 838 750 T3

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

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 4

ES 2 838 750 T3

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

Glu Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 5

ES 2 838 750 T3

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

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

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 6

ES 2 838 750 T3

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 7

ES 2 838 750 T3

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 8

ES 2 838 750 T3

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

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

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 9

ES 2 838 750 T3

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

ES 2 838 750 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 10

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 10

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

ES 2 838 750 T3

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

ES 2 838 750 T3

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 11

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 11

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

ES 2 838 750 T3

Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		115					120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
		180						185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
	195						200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		

ES 2 838 750 T3

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 12

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

ES 2 838 750 T3

Ala	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
		100						105				110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115				120						125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
		130				135				140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150				155						160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165				170						175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
		180						185				190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195				200						205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
		210				215				220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230				235						240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245				250						255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		260				265						270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275				280				285					
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
		290				295				300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310				315						320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325				330				335			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
		340				345				350					

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 13

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 13

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ES 2 838 750 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 14

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

ES 2 838 750 T3

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 15

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 15

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

ES 2 838 750 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 16

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 16

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

ES 2 838 750 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 17

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 17

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 18

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 18

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 19

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 19

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

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

Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

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

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

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 838 750 T3

85	90	95
Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
115	120	125
Gly Gly Val Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu		
130	135	140
Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
145	150	155
Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser		
165	170	175
Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro		
180	185	190
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile		
195	200	205
Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly		
210	215	220
His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
225	230	235
		240

Arg

<210> 20

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 20

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 838 750 T3

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ser Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Pro Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

Tyr Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 21

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 21

ES 2 838 750 T3

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

Arg

<210> 22

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 838 750 T3

<400> 22

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 23

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 838 750 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 23

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 24

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 24

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 25

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 25

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

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

Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			

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

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

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

Ala	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu
	130					135					140				

Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
145					150					155					160

Ser	Ile	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Gln	Ala
				165					170					175	

Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro
		180						185					190		

Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
		195				200						205			

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Gly
	210					215					220				

His	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
225					230					235					240

Arg

<210> 26

ES 2 838 750 T3

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 26

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Gln Ala
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 27

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 27

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile
195 200 205

Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly
210 215 220

His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 28

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 28

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
1          5          10          15

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
20          25          30

Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
35          40          45

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
50          55          60

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
65          70          75          80

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu
85          90          95

Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala
100         105         110

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115         120         125

Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130         135         140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
145         150         155         160

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
165         170         175

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro
180         185         190

```

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
225 230 235 240

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250 255

<210> 29

<211> 259

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His
1 5 10 15

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
35 40 45

Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
50 55 60

Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Leu Ile Ser
65 70 75 80

Arg Leu Asn Ile Tyr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Glu
85 90 95

Met Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105 110

Arg Gly Ser Tyr Pro Tyr Asn Tyr Phe Asp Ala Trp Gly Cys Gly Thr
115 120 125

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Ile Gln Glu Ser Ala Leu Thr

145											150											155											160
Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly																		
				165															170											175			
Ala	Val	Thr	Ala	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp																		
				180															185											190			
His	Cys	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	His	Asn	Asn	Arg	Pro	Pro	Gly																		
				195															200											205			
Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu																		
				210															215											220			
Thr	Ile	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala																		
				225															230											235			
Leu	Trp	Tyr	Ser	Asp	His	Trp	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr																		
				245															250											255			
Val	Leu	Gly																															
<210> 30																																	
<211> 256																																	
<212> PRT																																	
<213> Secuencia artificial																																	
<220>																																	
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético																																	
<400> 30																																	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln																		
1				5											10											15							
Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser																		
				20											25											30							
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr																		
				35											40											45							
Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly																		
				50											55											60							
Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys																		
				65											70											75							
Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu																		
				85											90											95							

Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro
180 185 190

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
225 230 235 240

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250 255

<210> 31

<211> 259

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His
1 5 10 15

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
35 40 45

ES 2 838 750 T3

Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
50 55 60

Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Leu Ile Ser
65 70 75 80

Arg Leu Asn Ile Tyr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Glu
85 90 95

Met Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105 110

Arg Gly Ser Tyr Pro Tyr Asn Tyr Phe Asp Ala Trp Gly Cys Gly Thr
115 120 125

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Ile Gln Glu Ser Ala Leu Thr
145 150 155 160

Thr Pro Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
165 170 175

Ala Val Thr Ala Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp
180 185 190

His Cys Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly His Asn Asn Arg Pro Pro Gly
195 200 205

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu
210 215 220

Thr Ile Ala Gly Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala
225 230 235 240

Leu Trp Tyr Ser Asp His Trp Val Ile Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr
245 250 255

Val Leu Gly

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: péptido de mamífero conservado

<400> 32

Ile Arg Asp Phe

1

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 33

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asp	Tyr	Leu	His
1				5					10	

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 34

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

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35

Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
1				5		

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 36

Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
1				5		

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 37

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 38

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 39

Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 40

Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 41

Tyr Ala Ser
1

<210> 42

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 42

Tyr Ala Ser
1

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 43

Gly His Ser Phe Pro Leu
1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44

Gly His Ser Phe Pro Leu
1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 45

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 47

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg
1 5 10

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 48

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg
1 5 10

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49

Gly His Ser Phe Pro Leu
1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 50

Gly His Ser Phe Pro Leu
1 5

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 51

Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 52

Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 53

Tyr Ala Ser
1

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 54

Tyr Ala Ser

1

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 55

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 56

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 57

Asn Tyr Asp Ile Asn

1

5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 58

Asn Tyr Asp Ile Asn

1

5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 59

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

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60

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

Gly

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 61

Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5				

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62

Gln	Thr	Thr	Gly	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5				

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 64

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
1 5

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 65

Pro Gly Asp Gly
1

<210> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66

Pro Gly Asp Asp
1

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 67

Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala
1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 68

Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala
1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 69

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

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70

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

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71

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

Lys Ala

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 72

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

Arg Val

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 73

Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala
1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 74

Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala
1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 75

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Asp
1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Asp
1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 77

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 78

Ile Phe Pro Gly Asp Asp Ser Thr
1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 79

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 80

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 81

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 81

tcagttttgg cccaggcggc c

21

<210> 82

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 82

accactagtt gggccggcct g

21

<210> 83

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 83

cttcgctgtt ttcaatatt ttctgtatt gcttcagttt tggcccaggc ggcc

54

<210> 84

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 84

gagccgccac cctcagaacc gccaccctca gagccaccac tagttgggcc ggctg

56

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 85

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
1 5

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: péptido de mamífero conservado

<400> 86

Ile Gln Asp Phe
1

<210> 87

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 87

ES 2 838 750 T3

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

<210> 88

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 88

ES 2 838 750 T3

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

<210> 89

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(4)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 89

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Val Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 90

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 90

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 91

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 91

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Val Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 92

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 838 750 T3

<400> 92

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 93

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 93

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 94

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 94

ES 2 838 750 T3

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

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

Asp Ile Asn Trp Ala Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Val Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Asn Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 95

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 95

```

Gln Val Xaa Leu Xaa Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
          20           25           30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          115          120          125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
          130          135          140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145          150          155          160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
          165          170          175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
          180          185          190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
          195          200

```

<210> 96

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 838 750 T3

<400> 96

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

<210> 97

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 97

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

ES 2 838 750 T3

20	25	30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
	85	90
Ala Arg Gln Thr Thr Ser Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	115	120
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu		
	130	135
Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
145	150	155
Glu Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser		
	165	170
Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro		
	180	185
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
	195	200

<210> 98

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 98

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

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

ES 2 838 750 T3

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

<210> 99

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(6)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(19)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 99

ES 2 838 750 T3

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
 165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
 180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200

<210> 100

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (170)..(171)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 100

```

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          115          120          125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
          130          135          140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145          150          155          160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Xaa Xaa Lys Ser His Glu Ser
          165          170          175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
          180          185          190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
          195          200

```

<210> 101

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 101

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Val Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 102

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 102

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Pro Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 103

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 103

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

<210> 104

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 104

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Ile Gly Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
 165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
 180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200

<210> 105

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 105

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

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

Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			

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

ES 2 838 750 T3

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

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

Ala Arg Gln Thr Thr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200

REIVINDICACIONES

1. Un agente de anticuerpo IgG humanizado que se une específicamente a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3, agente de anticuerpo que incluye un CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 que se exponen en SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 62, respectivamente (numeración de Kabat).
2. El agente de anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 13;
 - (ii) una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 15; o
 - (iii) una cadena ligera de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 8 y una cadena pesada de inmunoglobulina tal como se expone en SEQ ID NO: 16.
3. El agente de anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que la cadena ligera de inmunoglobulina se fusiona a un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31.
4. El agente de anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente de anticuerpo se conjuga con un agente terapéutico o agente de detección, en el que dicho agente terapéutico o agente de detección:
 - (i) es un radioisótopo, un conjugado de fármaco, una nanopartícula, una inmunotoxina o cualquier otra carga útil; o
 - (ii) es un agente de diagnóstico o de formación de imágenes, o ambos.
5. El agente de anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente de anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
6. El agente de anticuerpo según la reivindicación 5, que tiene una especificidad primera y segunda, y en el que la primera especificidad se une a la proteína 2Ig-B7H3 o 4Ig-B7H3 y la segunda especificidad se une a CD3 en células T o DOTA.
7. scFv de un agente de anticuerpo según la reivindicación 1 o 2 o scFv que comprende una secuencia de polipéptido tal como se expone en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 24, 26 y 27.
8. scFv según la reivindicación 7, en el que:
 - (i) el scFv se fusiona a un segundo polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29;
 - (ii) el scFv se conjuga con un agente terapéutico o agente de detección; y/o
 - (iii) el scFv forma parte de un receptor de antígeno quimérico.
9. Un agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que:
 - (i) el agente de anticuerpo suprime el efecto inhibitor de B7H3 sobre la proliferación de células T; o
 - (ii) el agente de anticuerpo suprime el efecto inhibitor de B7H3 sobre la actividad de linfocitos citotóxicos naturales.
10. Una composición farmacéutica que comprende el agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. El agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de cáncer, en el que el agente de anticuerpo va a administrarse a un paciente que lo necesita en una cantidad terapéuticamente eficaz.
12. El agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un tratamiento que comprende modular el sistema inmunitario, en el que el agente de anticuerpo va a administrarse a un paciente que lo necesita en una cantidad terapéuticamente eficaz.
13. El agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método de tratamiento de cáncer, en el que el cáncer es o comprende:
 - (i) un neuroblastoma; o

(ii) un cáncer de cuello uterino.

- 14. Un receptor de antígeno quimérico que comprende un agente de anticuerpo según la reivindicación 1.
- 15. Un ADN o ARN que codifica para un agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o el receptor de antígeno quimérico según la reivindicación 14.
- 5 16. Una célula que expresa un agente de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o el receptor de antígeno quimérico según la reivindicación 14.
- 17. Un método *in vitro* de preparación de una célula según la reivindicación 16, en el que el método comprende transfectar o transducir viralmente una célula con el ADN o ARN según la reivindicación 15, opcionalmente en el que la célula es una célula T o un linfocito citolítico natural.
- 10 18. Una vacuna que comprende el ADN o ARN según la reivindicación 15.

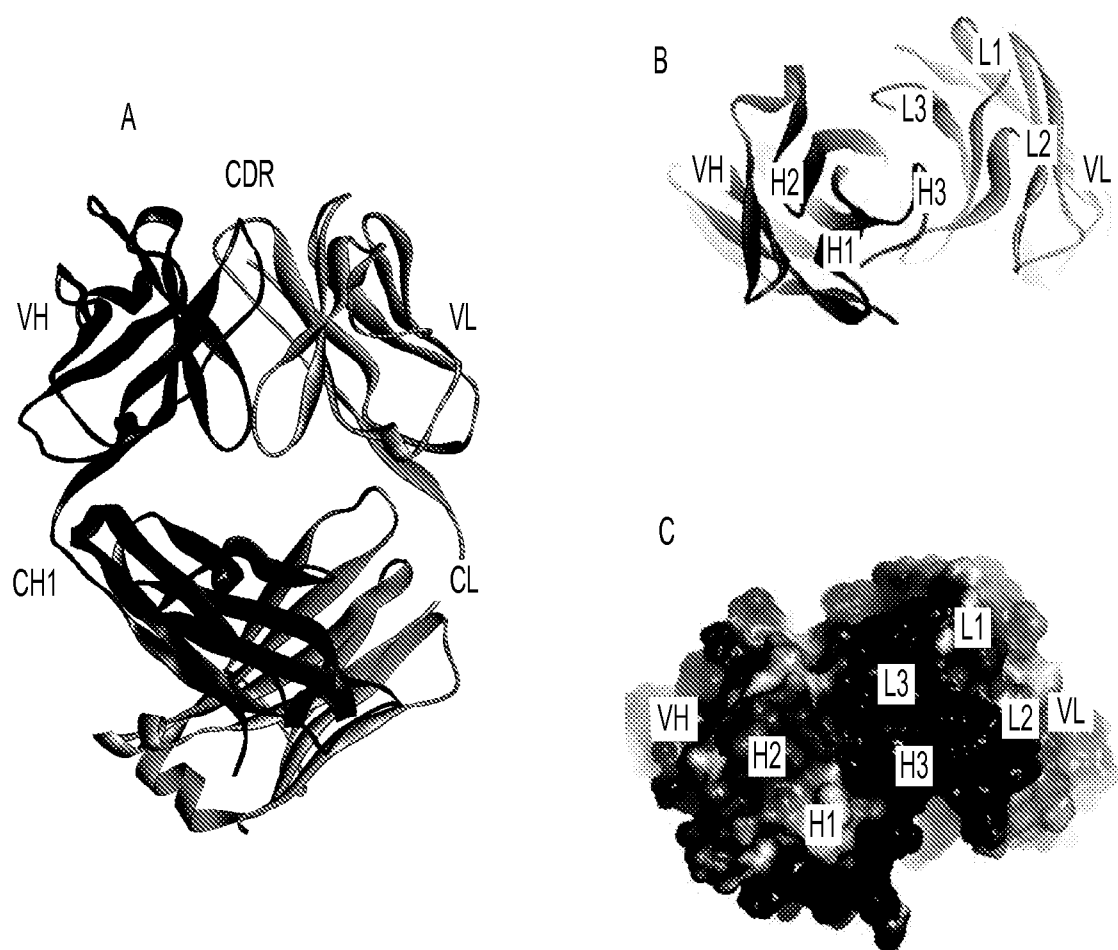


FIG. 1

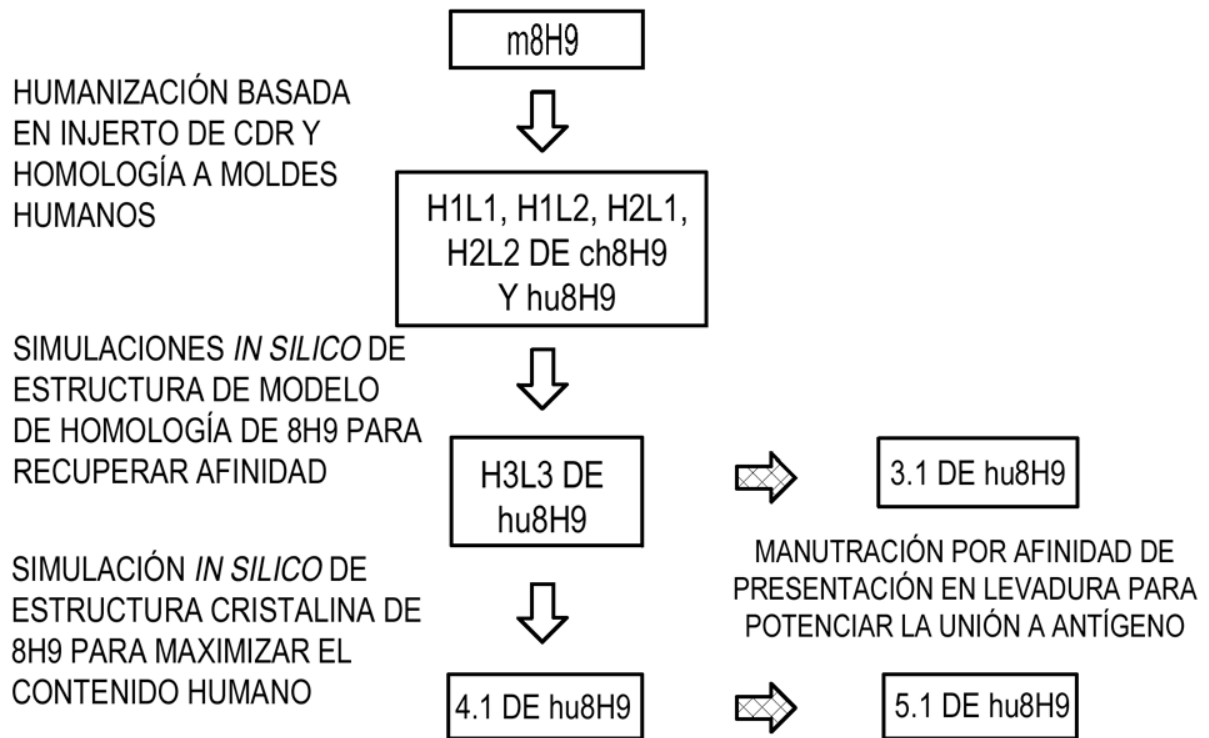


FIG. 2

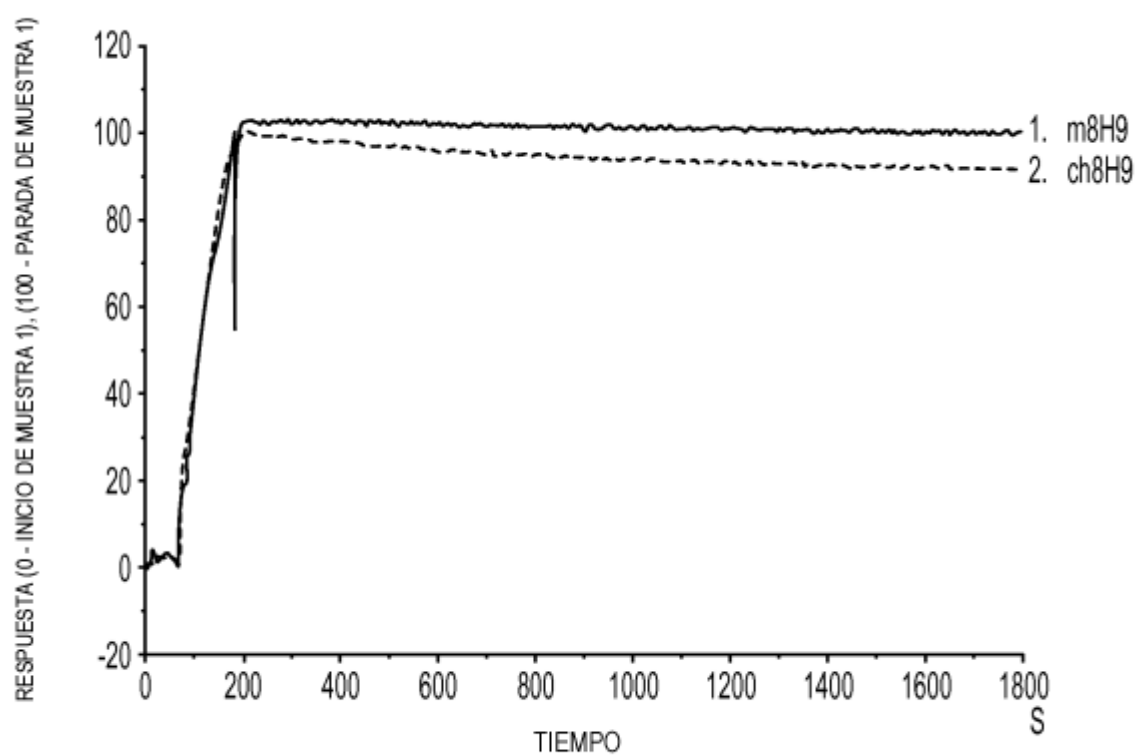


FIG. 3

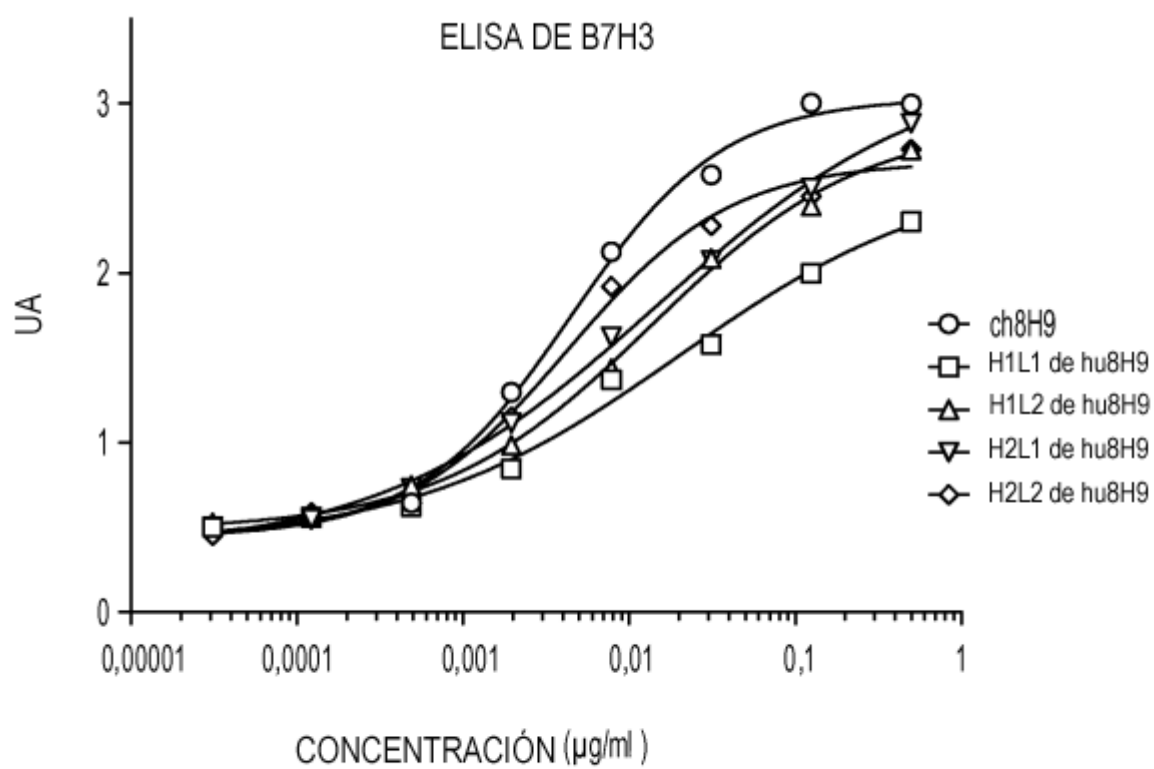


FIG. 4

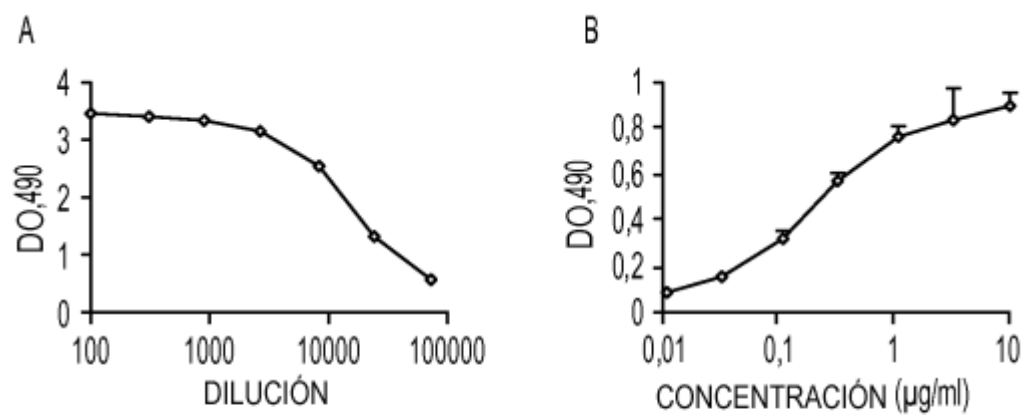


FIG. 5

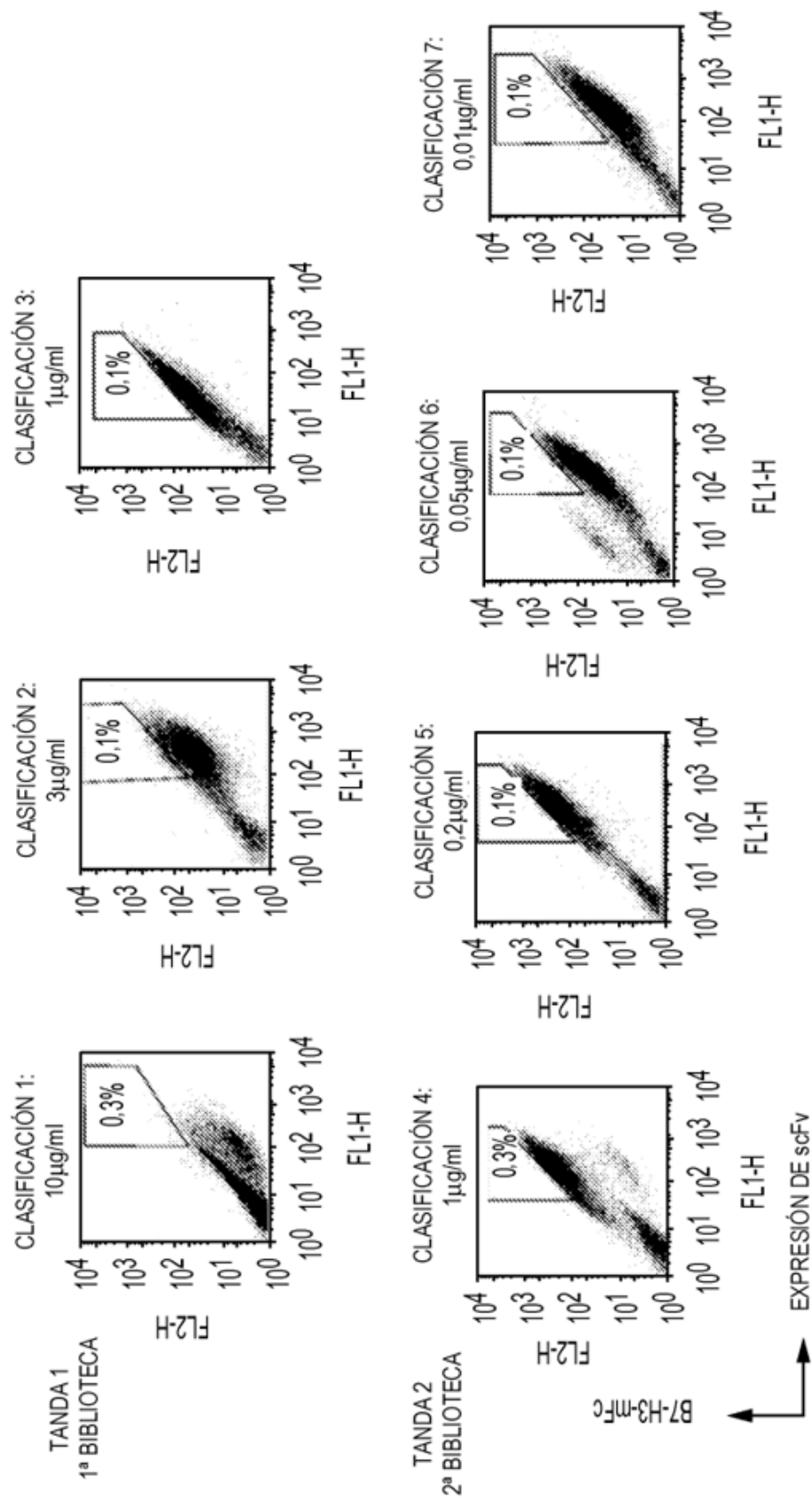


FIG. 6

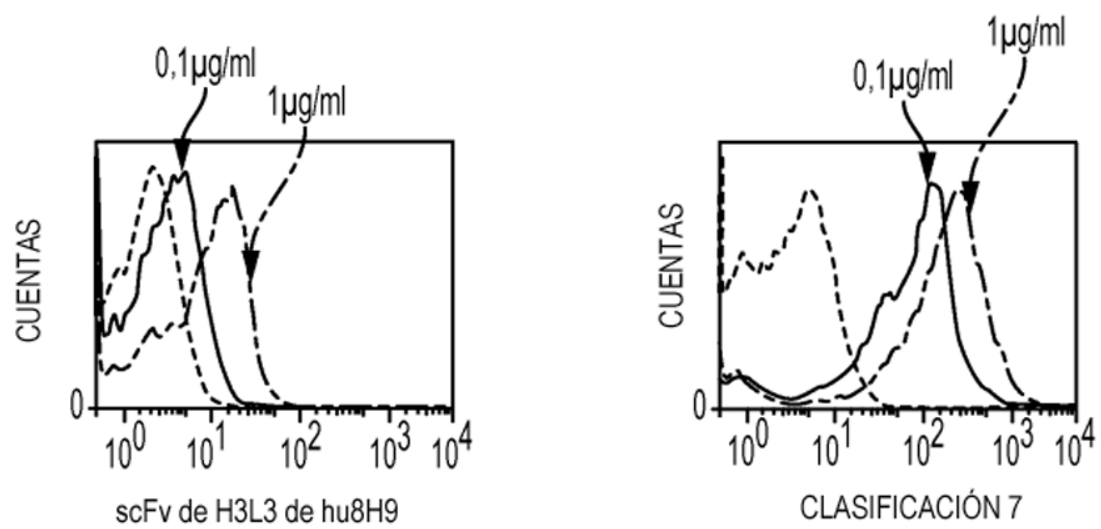


FIG. 7

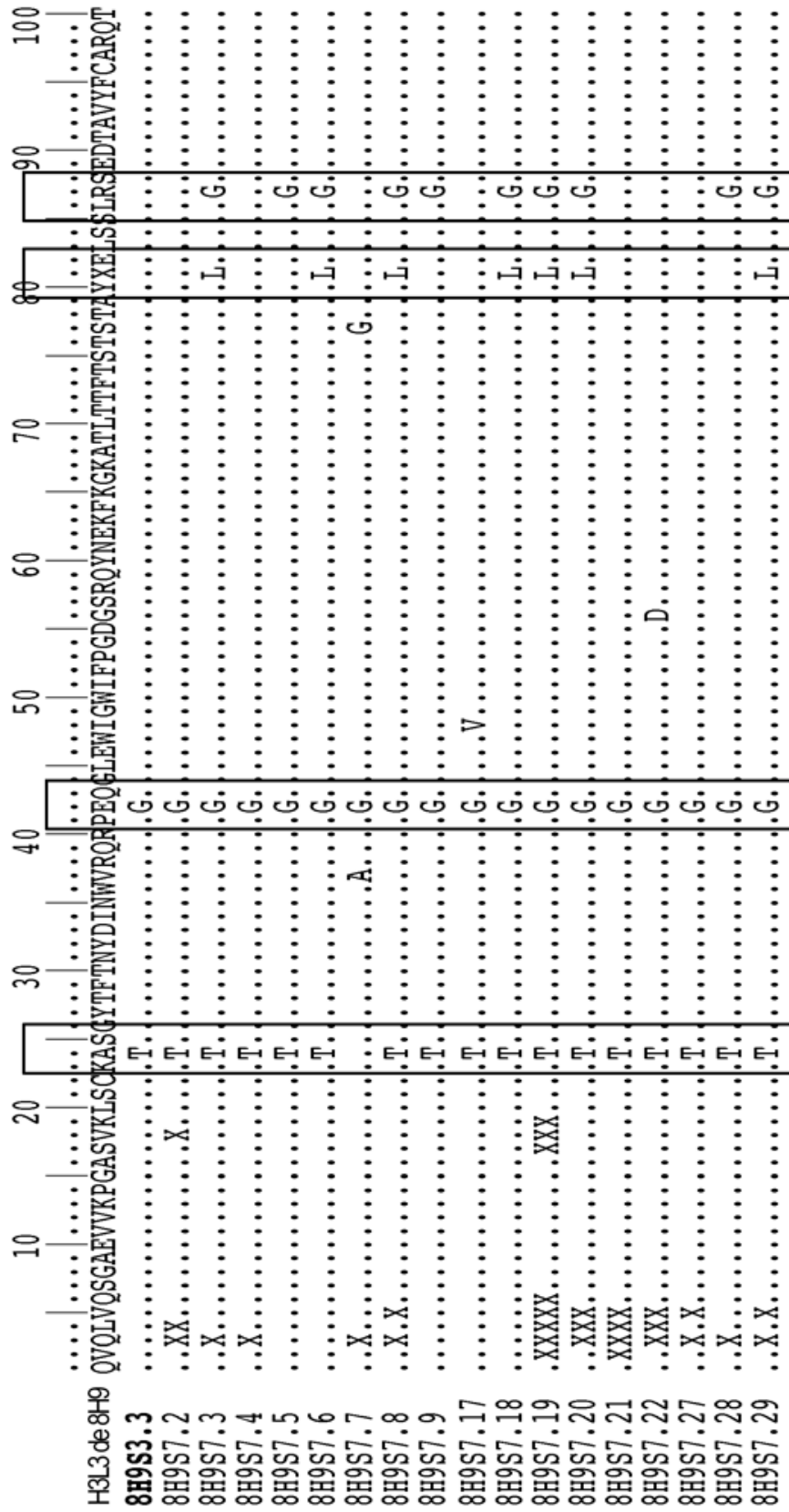


FIG. 8

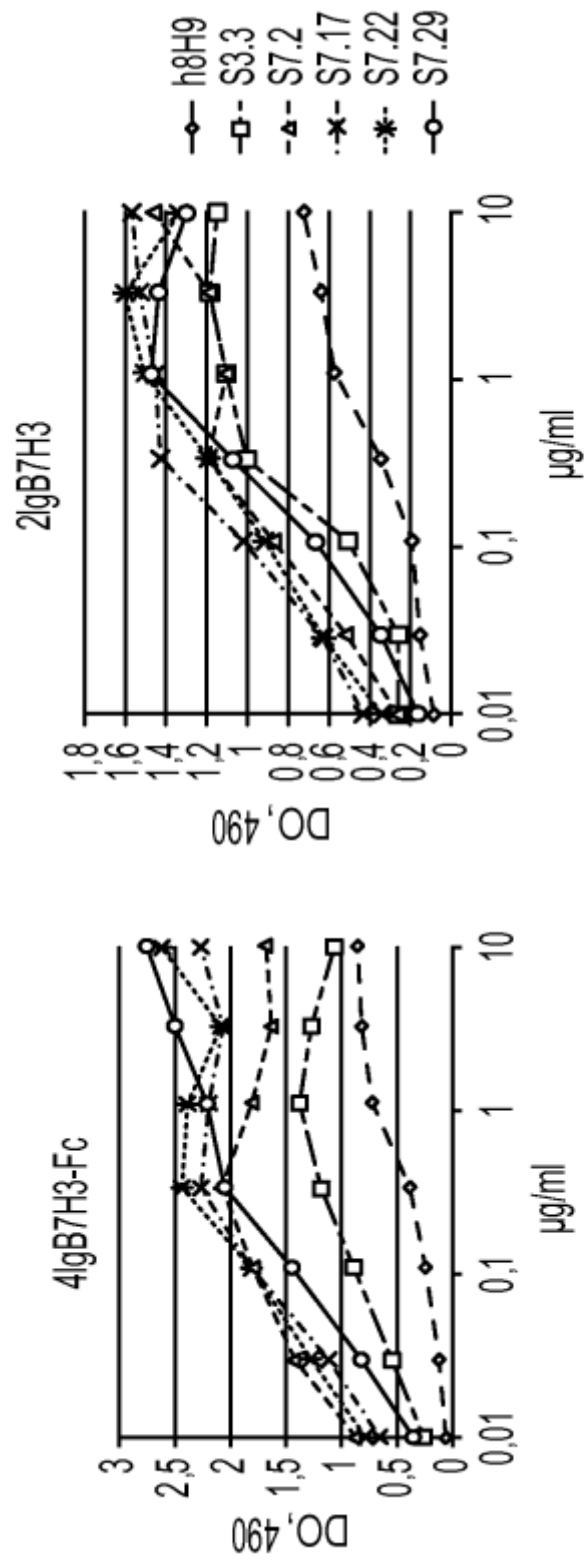


FIG. 9

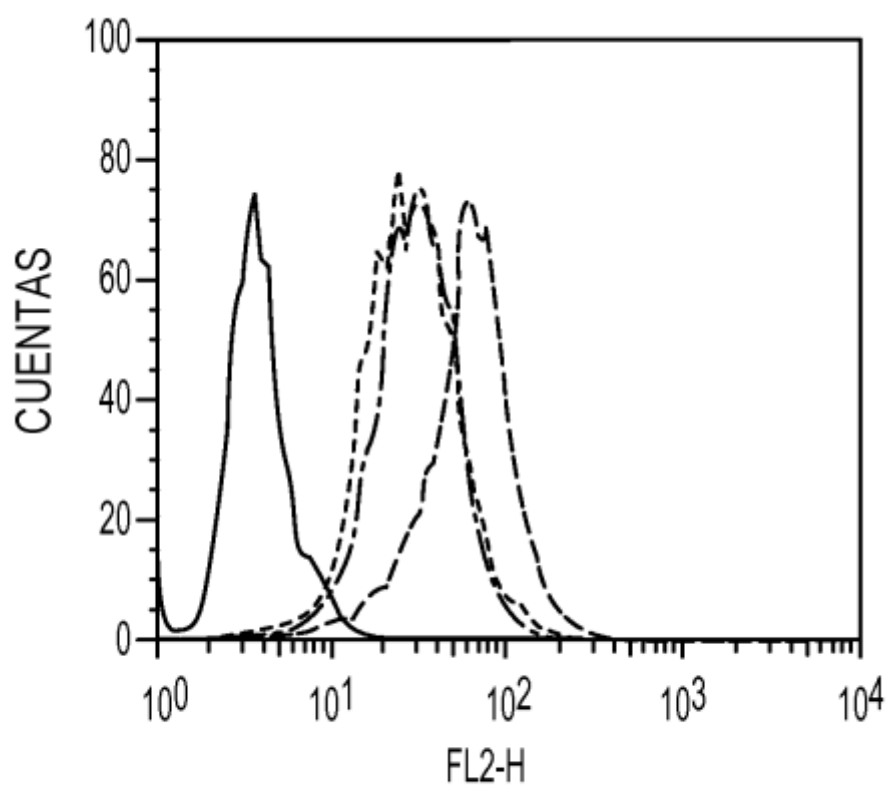


FIG. 10

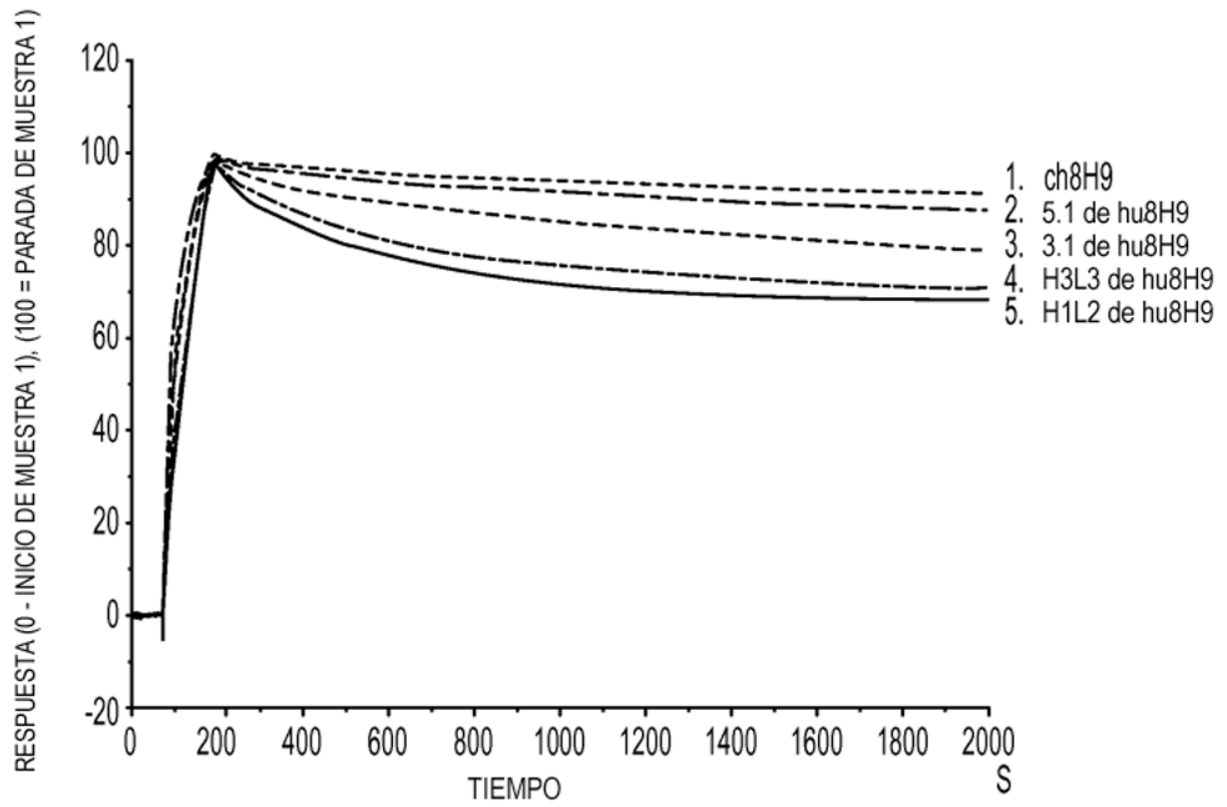


FIG. 11

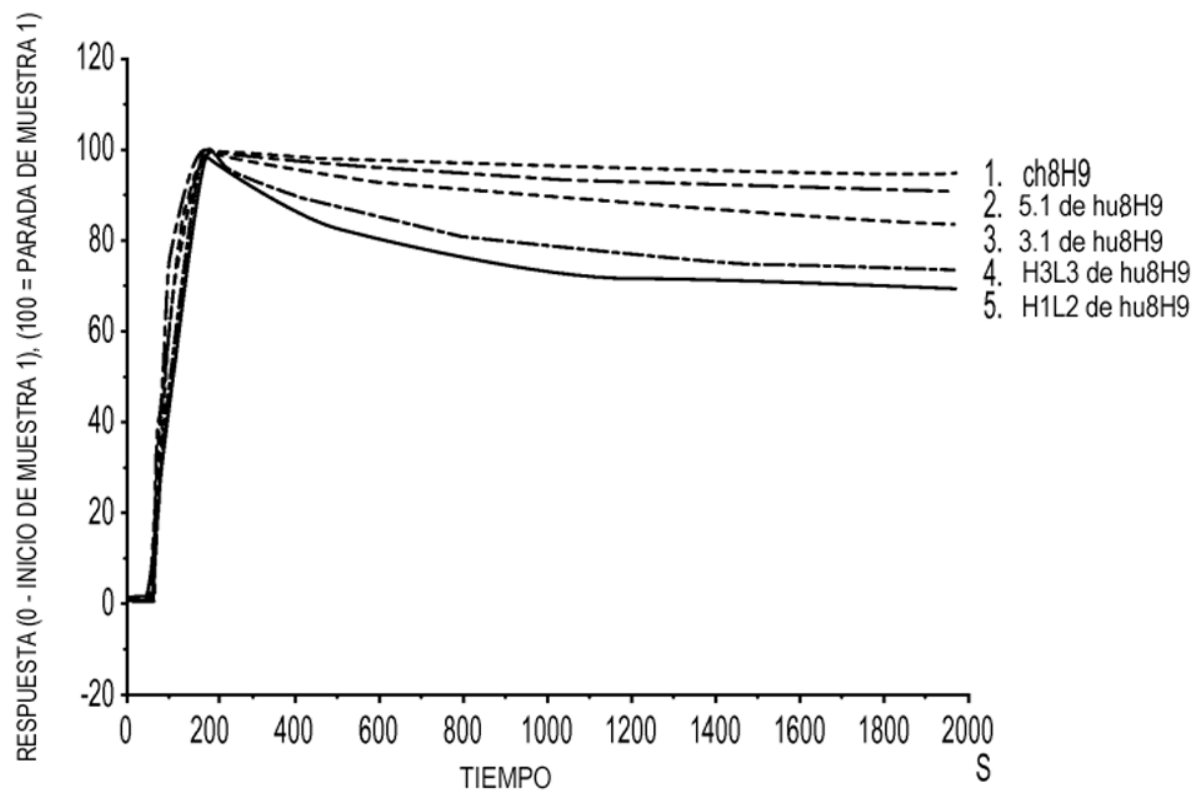


FIG. 12

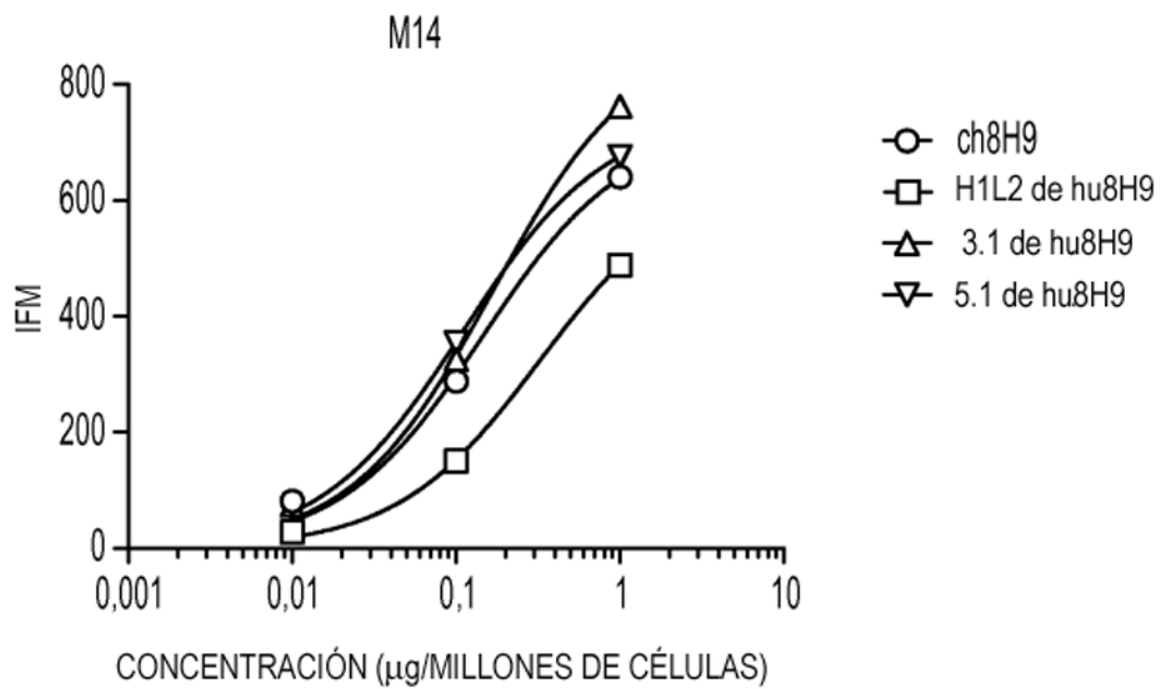


FIG. 13

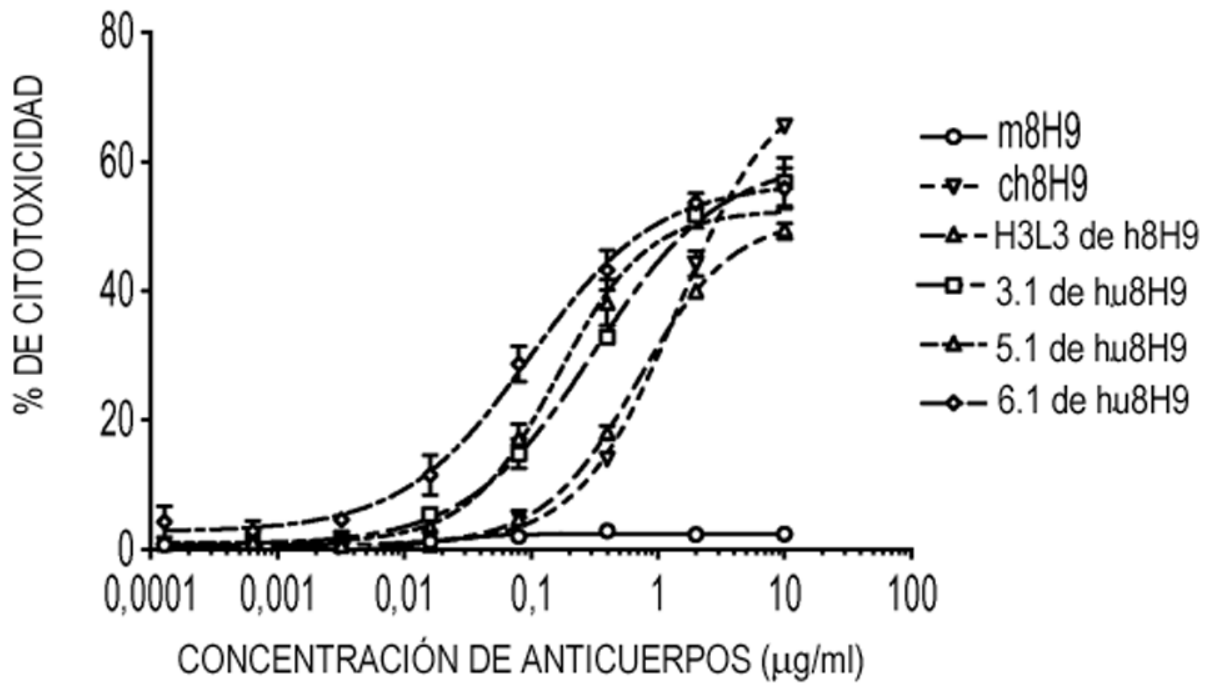


FIG. 14

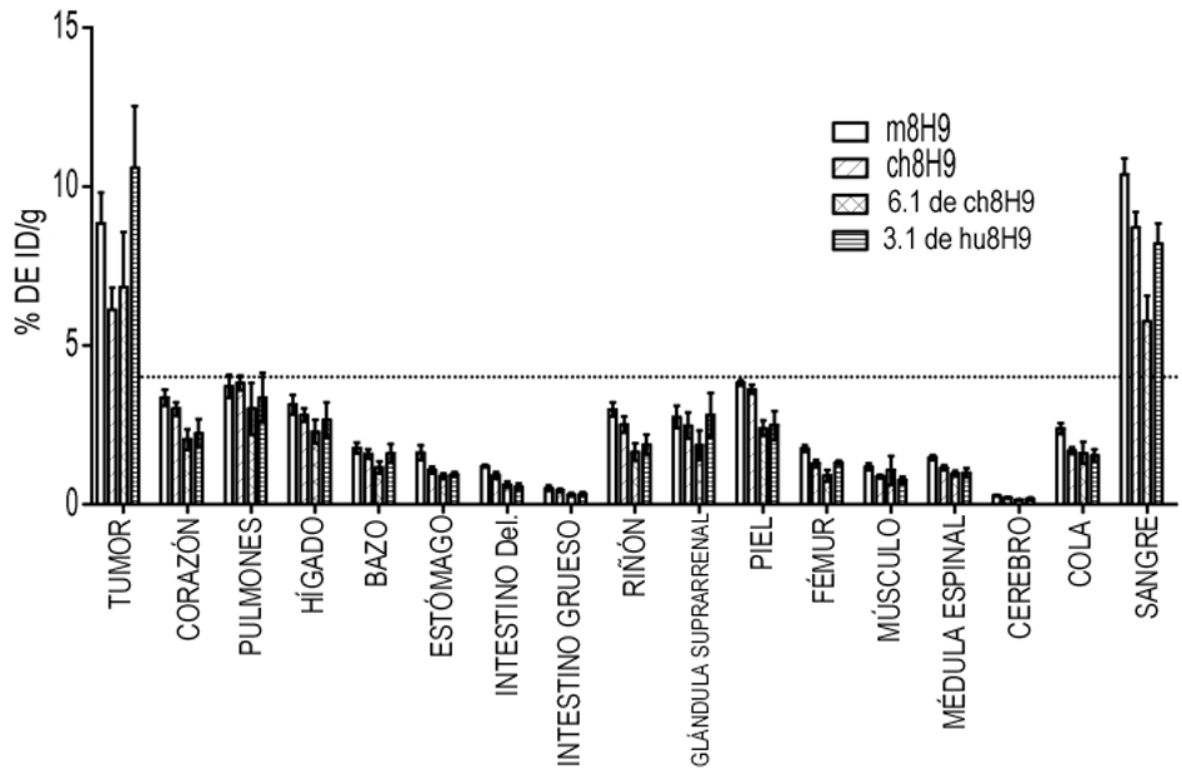


FIG. 15

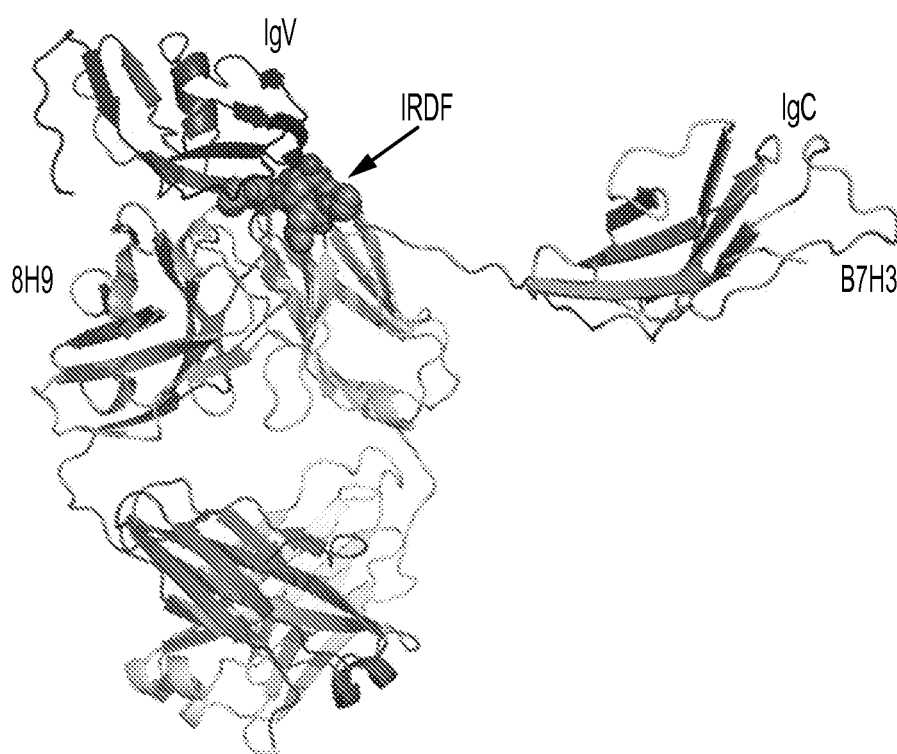


FIG. 16

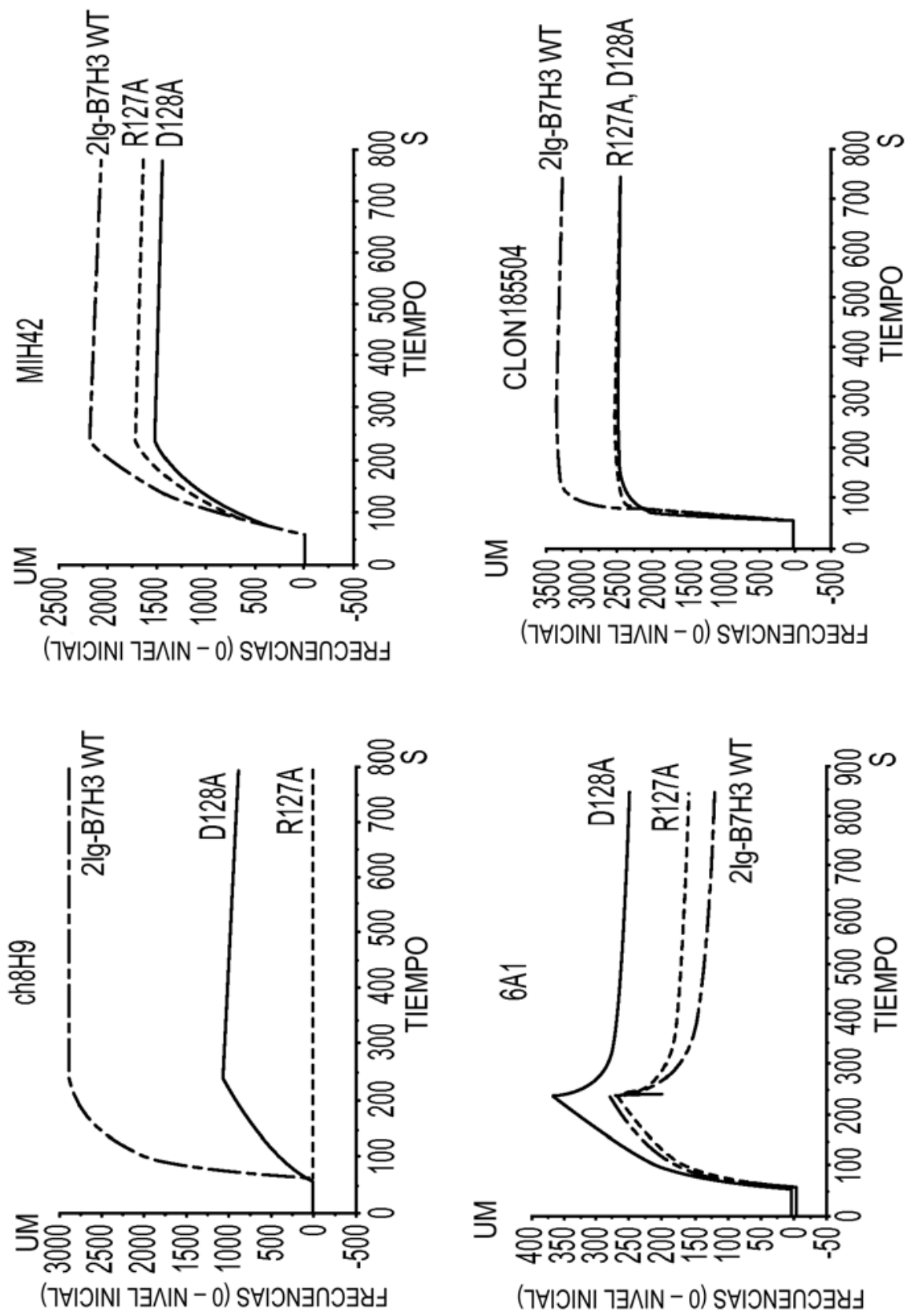


FIG. 17

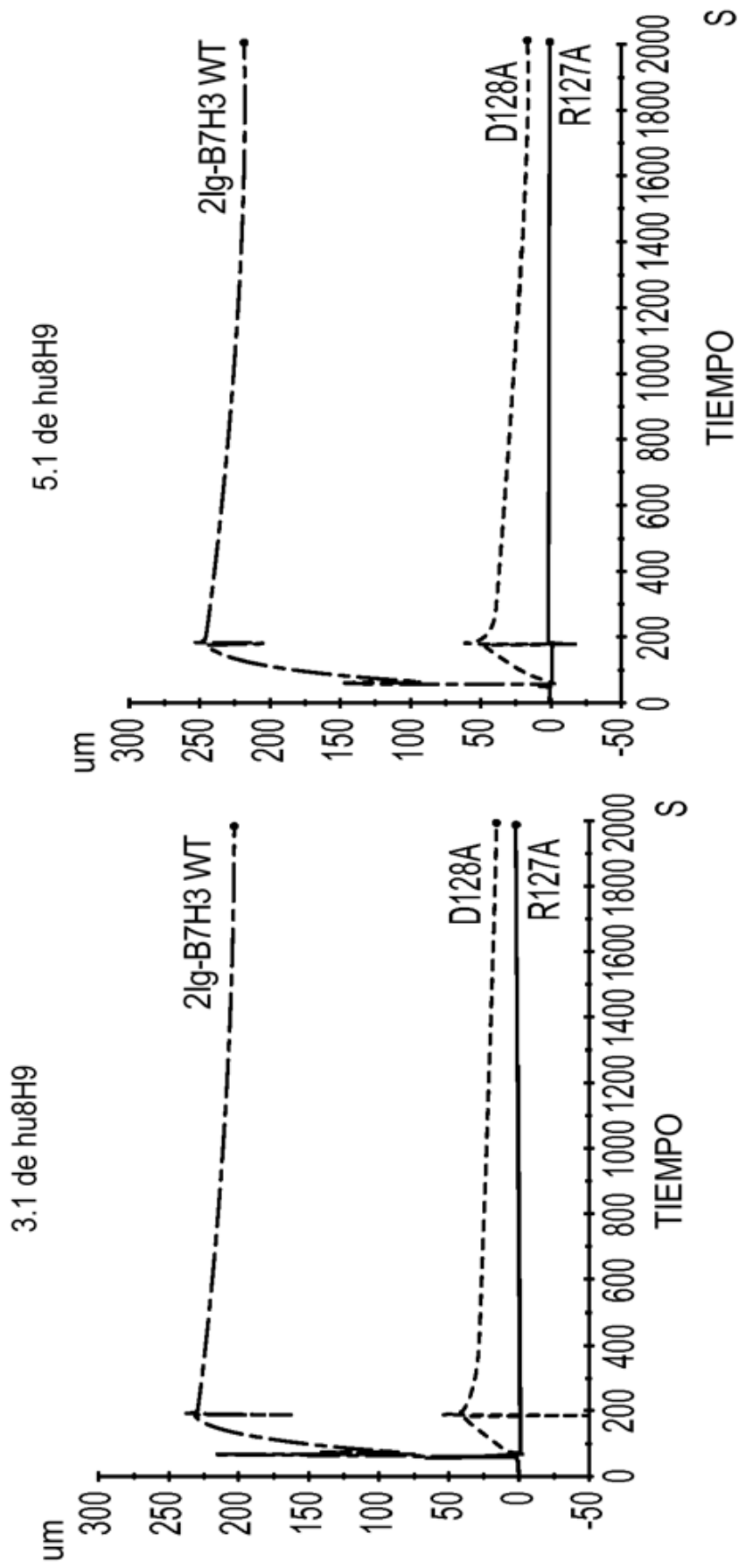


FIG. 18

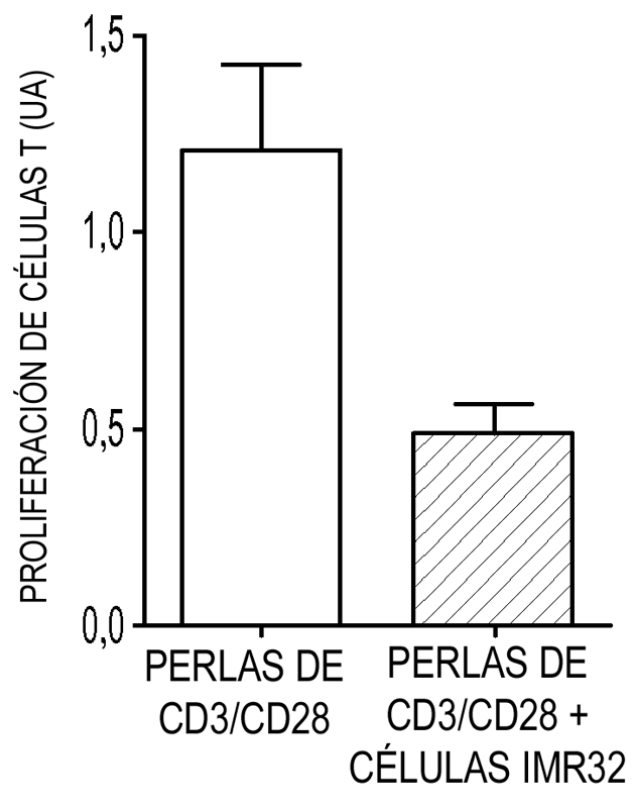
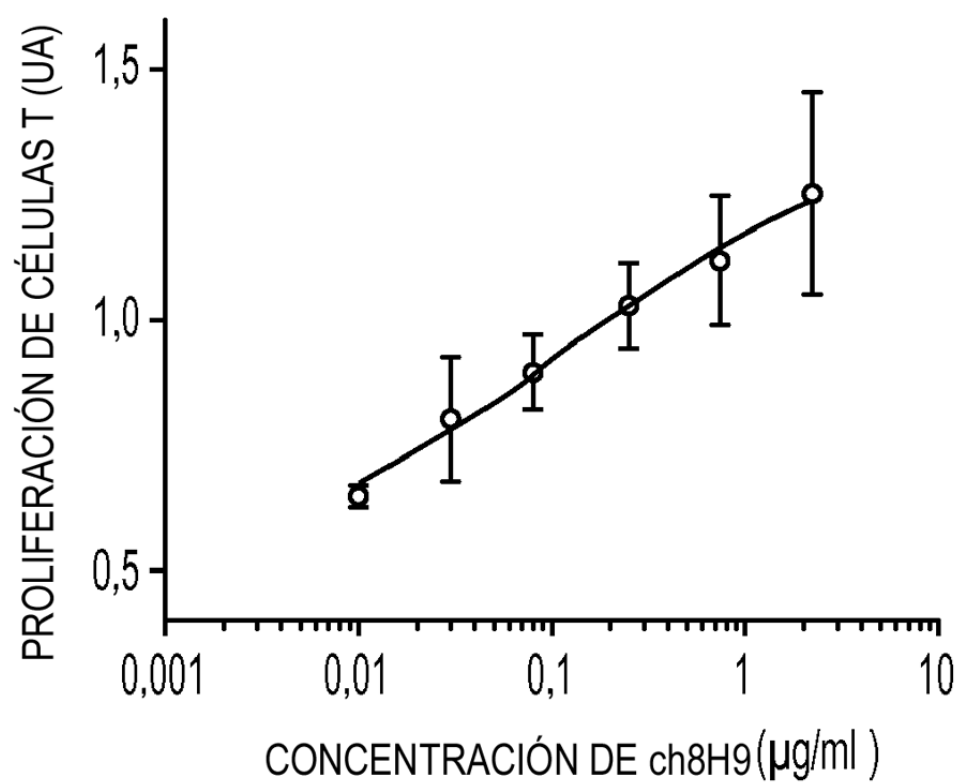


FIG. 19

**FIG. 20**

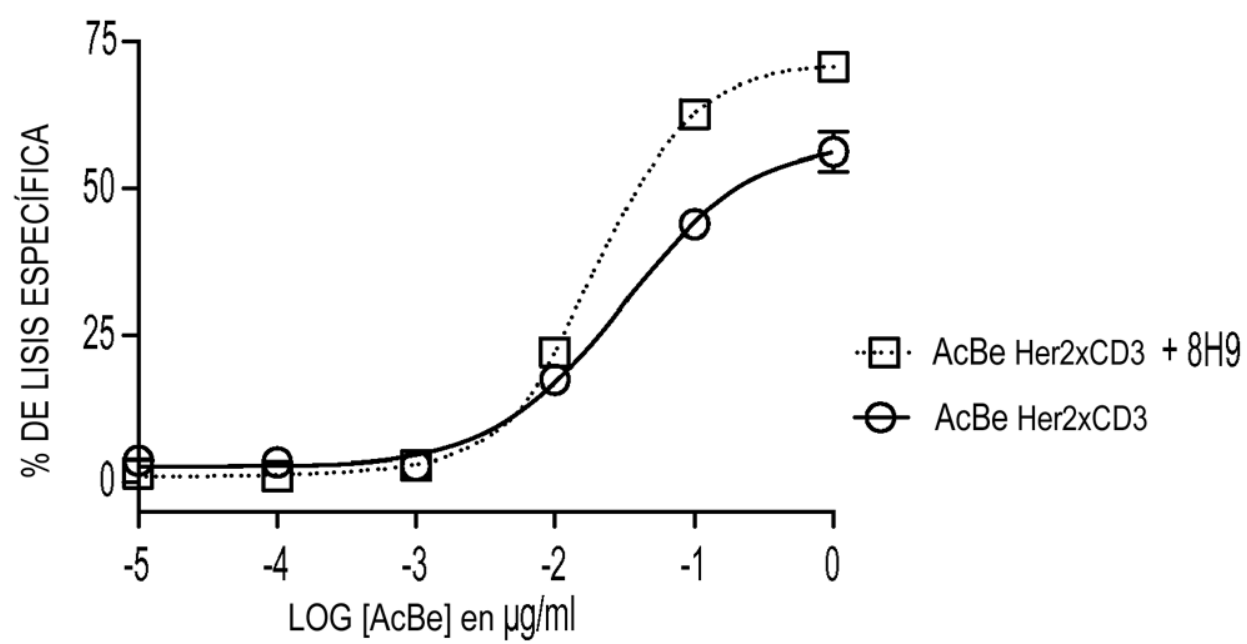


FIG. 21