

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 600**

51 Int. Cl.:

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2015 PCT/US2015/038666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16004108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2015 E 15815697 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3164159**

54 Título: **Proteínas de unión a CD33 y CD3 biespecíficas**

30 Prioridad:

01.07.2014 US 201462019795 P

03.02.2015 US 201562111470 P

09.03.2015 US 201514642497

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

11.10.2021

73 Titular/es:

**AMPHIVENA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
2 Tower Place, Suite 1000
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**ELLWANGER, KRISTINA;
EVNIN, LUKE;
FOX, JUDITH A.;
FUCEK, IVICA;
GUENOT, JEANMARIE;
KNACKMUSS, STEFAN;
KUNKEL, LORI;
LITTLE, MELVYN;
MOLKENTHIN, VERA;
RAJKOVIC, ERICH;
REUSCH, UWE;
WALL, CLAUDIA;
WEICHEL, MICHAEL y
ZHUKOVSKY, EUGENE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 863 600 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

Proteínas de unión a CD33 y CD3 biespecíficas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. N° 62/019.795, presentada el 1 de julio de 2014; la solicitud provisional de EE. UU. N° 62/111.470, presentada el 3 de febrero de 2015; y es una solicitud no provisional de EE. UU. de continuación N° 14/642.497, presentada el 9 de marzo de 2015.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias. El documento del Listado de secuencias, creado el 30 de junio de 2015, se llama 45375-704.601_SL.txt y tiene 147.965 bytes de tamaño.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La leucemia mieloide aguda (LMA) es una leucemia aguda en adultos y niños. CD33 se expresa en la mayoría de los mieloblastos en LMA. En algunos informes, CD33 está restringido, en general, a progenitores mieloide multilinaje tempranos y ausente de células madre hematopoyéticas pluripotentes normales. El documento de patente US2012251554 describe anticuerpos anti-CD33 y el uso de los mismos para el inmunodireccionamiento en el tratamiento de enfermedades asociadas a CD33.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención es como se define en las reivindicaciones.

20 En el presente documento se proporcionan proteínas de unión que se unen específicamente a CD33 humano, y proteínas de unión biespecíficas que se unen específicamente a CD33 humano y CD3 humano. En el presente documento también se proporcionan dominios variables anti-CD33 y dominios variables anti-CD3 para generar varias proteínas de unión a CD33/CD3 biespecíficas, tales como, por ejemplo, diacuerpos en tándem. También se proporcionan además en el presente documento diacuerpos en tándem biespecíficos que se unen a CD33 y CD3 y su uso para la inmunoterapia de leucemia mieloide aguda (LMA) y otros tumores malignos hematológicos, trastornos o afecciones.

25 En particular, se proporcionan proteínas de unión que muestran unión a tanto CD33 humano como de macaco cangrejero. Se muestra en los ejemplos que estos diacuerpos en tándem de CD33/CD3 pueden redirigir linfocitos T CD3⁺ policlonales de donante sano, así como linfocitos T autólogos de pacientes con LMA, para lisar eficazmente células de LMA CD33⁺ a bajas relaciones de células E:D. En este proceso, dependiendo de la presencia de tanto células diana CD33⁺ como linfocitos T, se activan los linfocitos T redirigidos, como se muestra por la inducción de CD25 y CD69, y se estimulan para la proliferación. Se muestra que el efecto anti-LMA de estos diacuerpos en tándem es dependiente de la concentración de los anticuerpos usados, así como de la relación de células E:D. El diacuerpo en tándem es tetravalente y tiene dos sitios de unión para CD33 y dos sitios de unión para CD3. Una característica particular de los diacuerpos en tándem de CD33/CD3 descritos en el presente documento es que facilitan la potente y eficiente apoptosis como resultado de la unión bivalente que confiere avidéz por cada antígeno, concretamente CD33 y CD3.

30 En resumen, las proteínas de unión a CD33/CD3 proporcionadas descritas en el presente documento, en particular los diacuerpos en tándem, inducen la potente citólisis de células leucémicas CD33⁺ y células primarias de LMA *in vitro*. Los ejemplos de proteínas de unión a CD33/CD3 biespecíficas en el formato de anticuerpo de los diacuerpos en tándem demuestran actividad citolítica *in vivo* en líneas celulares, células primarias de LMA y en modelos *in vivo* con líneas celulares de LMA y con células primarias de LMA derivadas de pacientes. Esto indica la alta actividad *in vivo*, especialmente considerable, en el modelo riguroso de XDP de LMA. Además, los ejemplos de proteínas de unión a CD33/CD3 biespecíficas en el formato de anticuerpo de los diacuerpos en tándem demuestran actividad citolítica *ex vivo* en muestras de pacientes en todas las etapas de LMA, que incluyen pacientes recientemente diagnosticados, recidivantes y resistentes al tratamiento.

45 Además, estas proteínas de unión a CD33/CD3 descritas en el presente documento son capaces de lograr una lisis significativa de células que expresan CD33 en el plazo de aproximadamente cuatro horas. Las proteínas de unión a CD33/CD3 presentan, por consiguiente, alta citotoxicidad a bajas densidades de CD33 sobre la superficie celular, así como una alta citotoxicidad a bajas relaciones efectoras:diana (E:D). Además, las proteínas de unión a CD33/CD3 descritas en el presente documento presentan no solo potentes afinidades de unión a CD33 y a CD3 por las proteínas humanas, sino que también muestran excelente reactividad cruzada con las respectivas proteínas de macaco cangrejero, por ejemplo con las relaciones de K_D humano:cangrejero entre 5 y 0,2. Además, las proteínas de unión a CD33/CD3 descritas en el presente documento no muestran inducción significativa de la liberación de citocinas en ausencia de células diana CD33⁺, que es un componente esencial del perfil de seguridad de estas moléculas. Además, los diacuerpos en tándem de CD33/CD3 descritos en el presente documento pertenecen a la clase de moléculas que tienen semividas en el intervalo aproximado de 8-24 h, que debe permitir una administración conveniente.

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan proteínas de unión a CD33 que se unen específicamente a un epítipo de CD33 humano. En algunos aspectos, las proteínas de unión comprenden un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable que deriva de humano.

5 En algunos aspectos de la divulgación, una proteína de unión a CD33 tiene al menos un sitio de unión que comprende un dominio de cadena ligera variable y un dominio de cadena pesada variable, en donde el dominio de cadena ligera variable comprende una CDR1 que consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21-27, una CDR2 que consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28-34 y una CDR3 que consiste en la secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35-41.

10 En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 tiene al menos un sitio de unión que comprende un dominio de cadena ligera variable y un dominio de cadena pesada variable, en donde el dominio de cadena pesada variable comprende una CDR1 que consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42-48, una CDR2 que consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 49-55 y una CDR3 que consiste en una secuencias seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56-63.

15 En ciertos casos, la CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio de cadena ligera variable se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 28 y 35; SEQ ID NO: 22, 29 y 36; SEQ ID NO: 23, 30 y 37; SEQ ID NO: 24, 31 y 38; SEQ ID NO: 25, 32 y 39; SEQ ID NO: 26, 33 y 40; y SEQ ID NO: 27, 34 y 41.

20 En ciertos casos, la CDR1, CDR2 y CD3 del dominio de cadena pesada variable se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42, 49 y 56; SEQ ID NO: 43, 50 y 57; SEQ ID NO: 43, 50 y 58; SEQ ID NO: 43, 50 y 59; SEQ ID NO: 43, 50 y 60; SEQ ID NO: 44, 51 y 61; SEQ ID NO: 45, 52 y 62; SEQ ID NO: 46, 53 y 63; SEQ ID NO: 47, 54 y 63; y SEQ ID NO: 48, 55 y 63.

25 En ciertos casos, el sitio de unión a CD33 humano de un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 19; y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 20.

En algunas realizaciones, el epítipo de CD33 está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano.

30 En cualquiera de los aspectos anteriores, la proteína de unión a CD33 comprende al menos un dominio funcional adicional. En algunos casos, el dominio funcional es un dominio efector que se une a una célula efectora. En ciertos casos, el dominio efector es un sitio de unión a CD3 que comprende al menos un dominio de cadena pesada variable del anticuerpo y al menos un dominio de cadena ligera variable que forma un sitio de unión al antígeno para CD3 humano.

35 En ciertos casos, el sitio de unión a CD3 comprende un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1 de STYAMN (SEQ ID NO: 72), una secuencia de CDR2 de RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) y una secuencia de CDR3 de HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74). En otros casos, el sitio de unión a CD3 comprende un dominio de cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDR1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), una secuencia de CDR2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) y una secuencia de CDR3 de ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

40 En ciertos casos, el sitio de unión a CD3 comprende un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 64 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 68; un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 65 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 69; un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 66 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 70; o un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 67 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 71.

45 En cualquiera de los aspectos anteriores, la proteína de unión a CD33 es una proteína dimérica. En cualquiera de los aspectos anteriores, la proteína de unión a CD33 es multifuncional.

50 En ciertos casos, la proteína de unión a CD33 multifuncional tiene biespecificidad por CD33 y CD3, en donde las especificidades de unión se proporcionan por el dominio de cadena pesada variable y los dominios de cadena ligera variables para CD33 y CD3 seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 12, 65 y 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 y 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 y 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 y 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 y 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 y 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 y 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 y 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 y 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 y 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 y 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 y 68; SEQ ID NO: 5, 15, 64 y 68; SEQ ID NO: 7, 17, 64 y 68; SEQ ID NO: 6, 16, 64 y 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 y 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 y 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 y 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 y 71; y SEQ ID NO: 10, 20, 64 y 68.

55 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan diacuerpos en tándem biespecíficos de unión al antígeno específicos para CD3 humano y CD33 humano. Según la invención, el diacuerpo en tándem es un diacuerpo en tándem específico para CD33 humano y CD3 humano, en donde dicho diacuerpo en tándem comprende un primer

5 polipéptido y un segundo polipéptido, teniendo cada polipéptido al menos cuatro dominios de cadena variables unidos uno después del otro, en donde cada polipéptido comprende (i) un dominio de cadena pesada variable (VH) específico para CD33 humano; (ii) un dominio de cadena ligera variable (VL) específico para CD33 humano; (iii) un dominio VH específico para CD3 humano, y (iv) un dominio VL específico para CD3 humano, en donde cada polipéptido comprende una combinación de cuatro dominios de cadena variables seleccionados del grupo que consiste en (a) SEQ ID NO: 3, 13, 64 y 68; (b) SEQ ID NO: 2, 12, 64 y 68; (c) SEQ ID NO: 4, 14, 64 y 68; (d) SEQ ID NO: 5, 15, 64 y 68; (e) SEQ ID NO: 6, 16, 64 y 68; o (f) SEQ ID NO: 9, 19, 64 y 68; y en donde en cada polipéptido, los cuatro dominios de cadena variables se unen uno después del otro por conectores peptídicos L1, L2 y L3 en el orden de: VL(CD33)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD33); VH(CD33)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD33); VL(CD33)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD33); o VH(CD33)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD33).

10 En algunas realizaciones, los conectores L1, L2 y L3 consisten en aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos. En ciertos casos, los conectores L1, L2 y L3 son cada uno independientemente GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97). En otros casos, los conectores L1 y L3 son GGSGGS (SEQ ID NO: 95) y el conector L2 es GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97).

15 En algunas realizaciones, un diacuerpo en tándem biespecífico es un diacuerpo en tándem 12 (SEQ ID NO: 109), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 19 (SEQ ID NO: 116) o 22 (SEQ ID NO: 119).

En algunas realizaciones, los diacuerpos en tándem de unión al antígeno biespecíficos poseen K_D de unión de 10 nM o menos a CD33 en células tumorales CD33⁺ seleccionadas de HL-60, KG-1 y U-937.

20 En algunas realizaciones, los diacuerpos en tándem de unión al antígeno biespecíficos se une específicamente a un epítipo de CD33 humano que está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano.

25 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan polinucleótidos que codifican una proteína de unión a CD33 o diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores. En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos. En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células hospedadoras transformadas con los vectores descritos.

En otro aspecto más, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a CD33 o diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto más, en el presente documento se proporcionan métodos de producción de una proteína de unión a CD33 o diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores que comprenden introducir en una célula hospedadora un polinucleótido que codifica una proteína de unión a CD33 o diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores, o un vector que comprende los polinucleótidos descritos, cultivar la célula hospedadora en condiciones por las cuales se expresa la proteína de unión a CD33 o el diacuerpo en tándem biespecífico, y purificar la proteína de unión a CD33 expresada o el diacuerpo en tándem biespecífico.

35 En el presente documento también se proporcionan métodos para el tratamiento de un cáncer CD33⁺ que comprende la administración de un diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores a un individuo que padece cáncer CD33⁺. En algunas realizaciones, el cáncer CD33⁺ es leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica de linfocitos B precursores, sarcoma mieloide, mieloma múltiple, linfoma agudo, linfoma linfoblástico agudo o leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). En algunas realizaciones, el cáncer CD33⁺ es leucemia mieloide aguda (LMA). En algunas realizaciones, el cáncer CD33⁺ es mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer CD33⁺ es leucemia linfoblástica aguda (LLA).

40 En el presente documento también se proporcionan métodos para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA) que comprenden la administración de un diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores a un individuo que padece LMA. En algunas realizaciones, la LMA es LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, neoplasias mieloides relacionadas con la terapia, sarcoma mieloide, proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas, o LMA no categorizada de otro modo. En algunas realizaciones, la LMA es LMA-M0, LMA-M1, LMA-M2, LMA-M3, LMA-M4, LMA-M5, LMA-M6 o LMA-M7. En realizaciones adicionales, la LMA se ha diagnosticado recientemente, es recidivante o resistente al tratamiento.

50 En el presente documento también se proporcionan métodos para el tratamiento de síndrome displásico mieloide (SDM) que comprende la administración de un diacuerpo en tándem biespecífico de cualquiera de las realizaciones anteriores a un individuo que padece SDM.

55 En el presente documento también se proporcionan métodos para el tratamiento de inmunosupresión por células supresoras derivadas de mieloides (CSDM) que comprenden la administración de un diacuerpo en tándem biespecífico en cualquiera de las realizaciones anteriores a un individuo que padece inmunosupresión.

En los métodos anteriores para el tratamiento, en ciertos casos, los métodos comprenden además administrar citarabina, azacitidina, decitabina, una antraciclina (por ejemplo, daunorubicina, idarubicina, doxorubicina y similares), amsacrina, fludarabina, clofarabina, cladribina, nelarabina, metotrexato, bortezomib, carfilzomib, melfalán, ibrutinib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, apremilast, una epipodófilotoxina (por ejemplo, etopósido, tenipósido y similares), una antracenodiona (por ejemplo, mitoxantrona, pixantrona, losoxantrona, piroxantrona, ametantrona y similares), un agente anti-CD20 (por ejemplo, rituximab, ocrelizumab, ofatumumab y similares) o combinaciones de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las novedosas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que los principios de la invención se utilizan, y los dibujos adjuntos de los cuales:

Figura 1 Representación esquemática de la organización génica y un orden de dominios de los diacuerpos en tándem de CD3/CD33 (TandAb®). Los diacuerpos en tándem se expresan como un único polipéptido que comprende cuatro dominios variables conectados por los conectores peptídicos cortos L1, L2 y L3. Después de la expresión, se asocian no covalentemente cabeza con cola dos polipéptidos monoméricos para formar la molécula de diacuerpo en tándem homodimérica funcional. L1, L2, L3: conector; V_H: dominio de cadena pesada variable; V_L: dominio de cadena ligera variable.

Figura 2 Diacuerpo en tándem que se acopla con CD3 y su modo de acción. Los diacuerpos en tándem son proteínas biespecíficas tetravalentes que se pueden acoplar a linfocitos T citotóxicos por unión a CD3. El diacuerpo en tándem se une a una célula tumoral CD33⁺ con dos de los cuatro dominios de unión y a CD3 con los otros dos dominios de unión. Este acontecimiento de unión linfocito T/célula diana (reticulación) promueve la activación del linfocito T y promueve la posterior destrucción de la célula tumoral por ADCC.

Figura 3 Variantes de orden de dominios de diacuerpos en tándem de CD33/CD3. Variaciones del orden de dominios de cadenas variables pesadas (VH) y variables ligeras (VL) dentro de secuencias de genes que codifican los diacuerpos en tándem permiten la producción de anticuerpos con especificidades por CD33 y CD3 situados sobre el interior o el exterior de la molécula. Se indican especificidades de dominio, localización de secuencias señal (ss) y conectores (L1, L2, L3) y marcas de afinidad (His), así como extremos 5' y 3'.

Figura 4 Comparación de linfocitos T de donante sano positivamente enriquecidos frente a negativamente seleccionados. Se incubaron células KG-1a con 10 pM (aprox. 1 ng/mL) y 25 pM (aprox. 2,5 ng/mL) de uno de los 10 diacuerpos en tándem seleccionados y ya fuera linfocitos T de donante sano negativamente seleccionados o positivamente seleccionados en una relación de células E:D de 1:1 o 3:1, como se indica. Después de 48 horas, se determinaron las cifras de células y se evaluó la citotoxicidad con tinción con DAPI. Los resultados se muestran como media ± EEM para el porcentaje de células muertas (paneles superiores) y el porcentaje de citotoxicidad específica (paneles inferiores) de 3 experimentos independientes realizados en pocillos duplicados.

Figura 5 Estrategia de análisis. Gráficos de dispersión y de histograma de una alícuota de linfocitos T de donante sano y 1 línea celular de LMA representativa (HL-60) y espécimen de LMA primario (AMP002) que ilustran cada uno la estrategia perseguida para determinar la citotoxicidad inducida por diacuerpos en tándem. FSC, dispersión hacia adelante; SSC, dispersión lateral.

Figura 6 Cribado de ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de LMA CD33⁺. Se incubaron células HL-60 (A,B) y KG-1a (C,D) parentales con 10 pM (aprox. 1 ng/mL) y 25 pM (aprox. 2,5 ng/mL) de una de las 22 moléculas de diacuerpo en tándem de CD33/CD3 o un diacuerpo en tándem de control no de unión (00) y linfocitos T de donante sano en una relación de células E:D de 1:1 (A,C) o 5:1 (B,D) como se indica. Después de 48 horas, se determinaron las cifras de células y se evaluó la citotoxicidad con tinción con DAPI para cuantificar la citotoxicidad específica de fármaco. Los resultados se muestran como media ± EEM para el porcentaje de células DAPI⁺ de 3 experimentos independientes realizados en pocillos duplicados. Se obtuvieron resultados cualitativamente similares cuando la citotoxicidad se expresó como el porcentaje de citotoxicidad específica.

Figura 7 Selección de especímenes primarios de LMA para el estudio. Se obtuvieron alícuotas congeladas de un total de especímenes primarios de LMA humana para análisis. Se determinó el porcentaje de blastos de LMA después de la descongelación por citometría de flujo basada en propiedades de CD45/dispersión lateral. Se determinó la viabilidad de los especímenes después de la descongelación, así como después de 48 horas en cultivo líquido que contiene citocinas (sin adición de moléculas de diacuerpo en tándem o linfocitos T de donante sano) por citometría de flujo usando DAPI como marcador de células vivas/muertas. Los resultados para la viabilidad después de la descongelación, así como después de 48 horas, se representan para todos los especímenes, que tuvieron >58 % de blastos de LMA. Cuadrados: Especímenes primarios de LMA que mostraron una viabilidad de >50% en la descongelación, así como >50 % después de 48 horas en cultivo líquido que contiene citocinas que se incluyeron en los análisis finales.

Figura 8 Citotoxicidad inducida por diacuerpos en tándem en especímenes primarios de LMA. Se incubaron los especímenes primarios de LMA con 2,5 pM (aprox. 250 pg/mL), 10 pM (aprox. 1 ng/mL) y 25 pM (aprox. 2,5 ng/mL) de una de las 9 moléculas de diacuerpo en tándem sin linfocitos T de donante sano añadidos (A) o con linfocitos T de donante sano en una relación de células E:D de o 1:3 (B) o 1:1 (C) como se indica. Después de 48 horas, se determinaron las cifras de células y se evaluó la citotoxicidad con tinción con DAPI para cuantificar la citotoxicidad específica de fármaco. Los resultados se muestran como media \pm EEM para el porcentaje de citotoxicidad específica de experimentos realizados en pocillos duplicados.

La **Figura 9A** es una secuencia del dominio extracelular de CD33 humano (aa 18 - 259) (SEQ ID NO: 93);

la **Figura 9B** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 1 (SEQ ID NO: 98);

la **Figura 9C** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 2 (SEQ ID NO: 99);

la **Figura 9D** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 3 (SEQ ID NO: 100);

la **Figura 9E** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 4 (SEQ ID NO: 101);

la **Figura 9F** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 5 (SEQ ID NO: 102);

la **Figura 9G** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 6 (SEQ ID NO: 103);

la **Figura 9H** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 7 (SEQ ID NO: 104);

la **Figura 9I** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 8 (SEQ ID NO: 105);

la **Figura 9J** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 9 (SEQ ID NO: 106);

la **Figura 9K** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 10 (SEQ ID NO: 107);

la **Figura 9L** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 11 (SEQ ID NO: 108);

la **Figura 9M** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 12 (SEQ ID NO: 109);

la **Figura 9N** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 13 (SEQ ID NO: 110);

la **Figura 9O** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 14 (SEQ ID NO: 111);

la **Figura 9P** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 15 (SEQ ID NO: 112);

la **Figura 9Q** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 16 (SEQ ID NO: 113);

la **Figura 9R** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 17 (SEQ ID NO: 114);

la **Figura 9S** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 18 (SEQ ID NO: 115);

la **Figura 9T** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 19 (SEQ ID NO: 116);

la **Figura 9U** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 20 (SEQ ID NO: 117);

la **Figura 9V** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 21 (SEQ ID NO: 118);

la **Figura 9W** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 22 (SEQ ID NO: 119);

la **Figura 9X** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 23 (SEQ ID NO: 120); y

la **Figura 9Y** es una secuencia completa del diacuerpo en tándem 24 (SEQ ID NO: 121). Las secuencias subrayadas representan los conectores L1, L2 y L3.

Figura 10 Efecto de los diacuerpos en tándem 16 y 12 sobre el crecimiento de células HL-60 en ratones NOD/scid. Se xenotrasplantaron ocho grupos experimentales de ratones NOD/scid inmunodeficientes por inyección subcutánea con una suspensión de 4×10^6 células HL-60 en el día 0. Antes de la inyección, se mezclaron células HL-60 con 3×10^6 linfocitos T purificados de donante sano. Todos los animales de los grupos experimentales trasplantados con células tumorales y linfocitos T recibieron un bolo intravenoso en los días 0, 1, 2, 3 y 4 de o vehículo (control) o diacuerpo en tándem 16 o 12 en tres niveles de dosis diferentes como se indica (0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g). Un grupo sin células efectoras y tratamiento con vehículo sirvió de control negativo adicional.

Figura 11 Actividad antitumoral del diacuerpo en tándem 16 en un modelo de xenoinjerto de LMA. Se irradiaron subletalmente (2 Gy) ratones NOD/scid y se inocularon por vía subcutánea con 4×10^6 células HL-60. En el día 9, los animales recibieron una única inyección en bolo de Ab de conejo anti-asialo GM1. Cuando los tumores

alcanzaron un volumen entre 50-150 mm³ (media 73 ± 11 mm³) en el día 10, los animales se asignaron a 3 grupos de tratamiento. Los grupos 2 y 3 (n = 8) se inyectaron por vía intraperitoneal con 1,5x10⁷ linfocitos T humanos expandidos y activados. Desde el día 13 hasta el día 21 (qdx9), los animales recibieron o diacuerpo en tándem 16 (grupo 3) o vehículo en la vena lateral de la cola (grupo 1 y grupo 2).

5 **Figura 12** Cantidad relativa (A) y cifras absolutas (B) de blastos de LMA humana en la médula ósea (MO) y bazo de ratones NSG en el día 38 después del tratamiento con 5 µg (0,25 mg/kg) o 50 µg (2,5 mg/kg) de diacuerpo en tándem de CD33/CD3 12 y 16.

10 **Figura 13** Cinética de la lisis de células diana mediada por el diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16. Se incubaron 1x10⁴ células diana HL-60 marcadas con calceína con linfocitos T humanos primarios como células efectoras en una relación E:D de 25:1 en presencia de diluciones sucesivas del diacuerpo en tándem 16 o sin anticuerpo (sin) durante 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o 5 h. En cada momento de tiempo, se usó calceína fluorescente liberada de células diana lisadas para calcular la lisis específica. Se presentan la media y DE de tres duplicados.

15 **Figura 14** Cinética de CE₅₀ y valores de lisis específica para el diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16. Se determinaron los valores de CE₅₀ (círculos negros rellenos) y lisis de células diana mediada por el diacuerpo en tándem 16 (cuadrados blancos) en ensayos de citotoxicidad por liberación de calceína en el momento indicado de las incubaciones por regresión no lineal/respuesta a dosis sigmoide y se representaron.

Figura 15 Actividad citotóxica en muestras de paciente con LMA recién diagnosticada, recidivante y resistente al tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La invención es como se define en las reivindicaciones.

Según un primer aspecto, en el presente documento se describen proteínas de unión que tienen especificidad por al menos CD33, preferentemente CD33 humano. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a CD33 tienen especificidad por CD33 humano y de cangrejero, es decir, reaccionan de forma cruzada. En algunas realizaciones, estas proteínas de unión reactivas de forma cruzada se unen a CD33 humano y de cangrejero con afinidad similar.

25 CD33 se expresa en células mieloides, por ejemplo, tales como los blastos de leucemia mieloide aguda (LMA). Para el aislamiento de dominios de anticuerpo específicos para CD33, tales como CD33 humano, se pueden cribar bibliotecas de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden cribar bibliotecas de presentación en fagos de IgM empleando, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante de CD33-Fc que contiene los aminoácidos 1-243 del dominio extracelular de CD33 humano (Figura 9A, SEQ ID NO: 93).

30 En algunos aspectos, la proteína de unión a CD33 tiene al menos un sitio de unión a CD33 que comprende un dominio de cadena ligera variable y un dominio de cadena pesada variable. El dominio de cadena ligera variable comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera y el dominio de cadena pesada variable comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada. En algunos aspectos, estas CDR de la cadena ligera (CDR1, CDR2 y CDR3) se seleccionan de las secuencias de CDR humanas mostradas en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 21-41). En ciertos casos, la CDR1 de la cadena ligera se selecciona de SEQ ID NO: 21-27. En ciertos casos, la CDR2 de la cadena ligera se selecciona de SEQ ID NO: 28-34. En ciertos casos, la CDR3 de la cadena ligera se selecciona de SEQ ID NO: 35-41.

35 En algunos aspectos, estas CDR de la cadena pesada (CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada) se seleccionan de las secuencias de CDR humanas mostradas en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 42-63). En ciertos casos, la CDR1 de la cadena pesada se selecciona de SEQ ID NO: 42-48. En ciertos casos, la CDR2 de la cadena pesada se selecciona de SEQ ID NO: 49-55. En ciertos casos, la CDR3 de la cadena pesada se selecciona de SEQ ID NO: 56-63.

40 En algunos aspectos, las CDR ligeras y pesadas se seleccionan sin las secuencias de la región estructural circundantes de los dominios variables respectivos, que incluyen secuencias de la región estructural de otras inmunoglobulinas o regiones estructurales consenso, opcionalmente se mutan y/o sustituyen aún más por otras secuencias de la región estructural adecuadas. Por tanto, en el presente documento se proporciona en algunos aspectos una proteína de unión a CD33 que comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 21; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 28 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 35. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 22; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 29 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 36. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 23; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 30 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 37. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 24; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 31 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 38. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 25; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 32 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 39. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 26; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 33 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 40. En algunos aspectos, una proteína de unión a

CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable, en donde la cadena ligera CDR1 es SEQ ID NO: 27; la cadena ligera CDR2 es SEQ ID NO: 34 y la cadena ligera CDR3 es SEQ ID NO: 41.

También se proporciona en el presente documento en algunos aspectos una proteína de unión a CD33 que comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 42; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 49 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 56. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 43; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 50 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 57. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 43; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 50 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 58. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 43; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 50 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 59. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 43; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 50 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 60. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 44; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 51 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 61. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 45; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 62. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 46; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 53 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 63. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 47; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 54 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 63. En algunos aspectos, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable, en donde la CDR1 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 48; la CDR2 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 55 y la CDR3 de la cadena pesada es SEQ ID NO: 63.

En aspectos adicionales, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable seleccionado de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-10 mostradas en la Tabla 3. En aspectos adicionales, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena pesada variable seleccionado de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 11-20 mostradas en la Tabla 4. En aspectos aún adicionales, una proteína de unión a CD33 comprende un dominio de cadena ligera variable seleccionado de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-10 mostradas en la Tabla 3 y un dominio de cadena pesada variable seleccionado de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 11-20 mostradas en la Tabla 4.

El término "proteína de unión" se refiere a un derivado de inmunoglobulina con propiedades de unión al antígeno, es decir, polipéptidos de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos que contienen un sitio de unión al antígeno. La proteína de unión comprende dominios variables de un anticuerpo o fragmentos del mismo. Cada dominio de unión al antígeno está formado por un anticuerpo, es decir, inmunoglobulina, dominio de cadena pesada variable (VH) y un dominio de cadena ligera variable (VL) de anticuerpo que se une al mismo epítoto, mientras que el dominio de cadena pesada variable (VH) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada: CDR1, CDR2 y CDR3; y el dominio de cadena ligera variable (VL) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena ligera: CDR1, CDR2 y CDR3. En algunos casos, la proteína de unión según algunas realizaciones en el presente documento carece de dominios constantes de inmunoglobulina. En algunos casos, los dominios de cadena ligera y pesada variables que forman el sitio de unión al antígeno se unen covalentemente entre sí, por ejemplo, por un conector peptídico, o en otros casos, los dominios de cadena ligera y pesada variables se asocian no covalentemente entre sí para formar el sitio de unión al antígeno. El término "proteína de unión" también se refiere a fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpo que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv de una sola cadena, Fv de una sola cadena en tándem ((scFv)₂, enlazadores de linfocitos T biespecíficos (BiTE®), anticuerpos de reorientación de doble afinidad (DART™), diacuerpo y diacuerpo en tándem (TandAb®). Además, en ciertos casos, la proteína de unión es multivalente, es decir, tiene dos, tres o más sitios de unión para CD33.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera variable anti-CD33

CDR	Identificador de secuencia	Secuencia de CDR de cadena ligera
CDR1	SEQ ID NO: 21	GGNNIGSTTVH
	SEQ ID NO: 22	SGSRNIGSNTVN
	SEQ ID NO: 23	SGSSNIGSNTVN
	SEQ ID NO: 24	TGSSNIGAGYDVH
	SEQ ID NO: 25	SGSSNIGSNIVN
	SEQ ID NO: 26	SGSSNIGSNTVK
	SEQ ID NO: 27	SGSSNIGDNVVN
CDR2	SEQ ID NO: 28	DDNERPS
	SEQ ID NO: 29	GNNQRPS
	SEQ ID NO: 30	SDNQRPS
	SEQ ID NO: 31	GNSNRPS
	SEQ ID NO: 32	SNNQRPS
	SEQ ID NO: 33	SNNQRSS
	SEQ ID NO: 34	STNKRPS
CDR3	SEQ ID NO: 35	QVWDSGSDH
	SEQ ID NO: 36	ATWDDSLIG
	SEQ ID NO: 37	ATWDDSLNG
	SEQ ID NO: 38	QSYDSSLSD
	SEQ ID NO: 39	AAWDDSLKG
	SEQ ID NO: 40	AAWDDSLNG
	SEQ ID NO: 41	AAWDDSLSA

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada variable anti-CD33

CDR	Identificador de secuencia	Secuencia de CDR de cadena pesada
CDR1	SEQ ID NO: 42	SNYGIH
	SEQ ID NO: 43	TSYDIN
	SEQ ID NO: 44	TSYMH
	SEQ ID NO: 45	TSYWIG
	SEQ ID NO: 46	SSYAIS
	SEQ ID NO: 47	SSYGIS
	SEQ ID NO: 48	DSYAIS
CDR2	SEQ ID NO: 49	LISYDGNKKFYADSVKG
	SEQ ID NO: 50	WMNPNSGNTGFAQKFQG

CDR	Identificador de secuencia	Secuencia de CDR de cadena pesada
	SEQ ID NO: 51	GIINPSGGSTSYAQKFQG
	SEQ ID NO: 52	IIPGDSDRYSPSFQG
	SEQ ID NO: 53	GIYPIFGSANYAQKFQG
	SEQ ID NO: 54	GIIPFGSAHYAQKFQG
	SEQ ID NO: 55	GIIPFGSAHYSQKFQG
CDR3	SEQ ID NO: 56	DRLESAAFDY
	SEQ ID NO: 57	DRANTDFSYGMDV
	SEQ ID NO: 58	DRAVTDYYYGMDV
	SEQ ID NO: 59	DRANTDYSFGMDV
	SEQ ID NO: 60	DRANTDYSLGMDV
	SEQ ID NO: 61	DVVPAAIDYYGMDV
	SEQ ID NO: 62	HKRGSDAFDI
	SEQ ID NO: 63	EYYYSSEWAFDI

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de todos los dominios de cadena ligera variable anti-CD33 (las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera variable están en negrita y subrayadas)

clon anti-CD33	Identificador de secuencia	Secuencia del dominio de cadena ligera variable (VL)
01	SEQ ID NO: 1	SYELTQPPSVSVAPGQTAMITC <u>GGNIGSTTVH</u> WYQQKPGQAPVLVY <u>DDNERPS</u> GIPERFSGSNSGSTATLTINRVEAGDEADYYC <u>QVWDSGSD</u> <u>HVVFGGGTKLTVL</u>
02	SEQ ID NO: 2	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSRNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNNORPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
03	SEQ ID NO: 3	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSRNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNNORPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
04	SEQ ID NO: 4	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSRNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNNORPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
05	SEQ ID NO: 5	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSRNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNNORPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
06	SEQ ID NO: 6	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>SDNORPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLN</u> <u>GAVFGGGTKLTVL</u>
07	SEQ ID NO: 7	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTIS <u>TGSSNIGAGYDVH</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNSNRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC <u>QSYDSSL</u> <u>SDVVFGGGTKLTVL</u>
08	SEQ ID NO: 8	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGSNIVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNORPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLKG</u> <u>YVFGGGTKLTVL</u>

clon anti-CD33	Identificador de secuencia	Secuencia del dominio de cadena ligera variable (VL)
09	SEQ ID NO: 9	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC <u>SGSSSNIGSNTVK</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>SNNQRSS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLN</u> <u>GYVFGGGTKLTVL</u>
10	SEQ ID NO: 10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC <u>SGSSSNIGDNVYN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>STNKRPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLS</u> <u>AYVFGGGTKLTVL</u>

Tabla 4: Secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable anti-CD33 (las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada variable están en negrita y subrayadas)

clon anti-CD33	Identificador de secuencia	Secuencia de dominio de cadena pesada variable (VH)
01	SEQ ID NO: 11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>SNYGIH</u> WVRQAPGQGLEWVA <u>LISYDGNKKFYADSVKGR</u> FAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAK <u>DRLESAAFDYWGQGLTVTVSS</u>
02	SEQ ID NO: 12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDFSYGMDVWGQGLTVTVSS</u>
03	SEQ ID NO: 13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC <u>ARDRAVTDYGGMDVWGQGLTVTVSS</u>
04	SEQ ID NO: 14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYSGMDVWGQGLTVTVSS</u>
05	SEQ ID NO: 15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYSLGMDVWGQGLTVTVSS</u>
06	SEQ ID NO: 16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYMH</u> WVRQAPGQGLEWV <u>MGIINPSGGSTSYAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC <u>ARDVVPAAIDYGGMDVWGQGLTVTVSS</u>
07	SEQ ID NO: 17	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYWI</u> WVRQMPGKGLEWV <u>GHIYPGSDTRYSPSFOGR</u> VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HKRGSDAFDI</u> WGQGLTVTVSS
08	SEQ ID NO: 18	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>SSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GIYPIFGSANYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARE <u>YYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
09	SEQ ID NO: 19	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>SSYGIS</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GGIPIFGSAHYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMESSLRSEDTAVYYCAR <u>EYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
10	SEQ ID NO: 20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>DSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWV <u>GGIPIFGSAHYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARE <u>YYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS

- 5 En algunos aspectos, se selecciona una proteína de unión que confiere especificidad a CD33 de una de las siguientes combinaciones de un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable que forman el sitio de unión a CD33 humano mostrado en la Tabla 3 y en la Tabla 4. Los ejemplos no limitantes incluyen (i) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 11, (ii) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, (iii) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13, (iv) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14, (v) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 15, (vi) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 16, (vii) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 17, (viii) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 18, (ix) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 19, y (x) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 20.

En el presente documento también se describen proteínas de unión que no solo tienen especificidad por CD33, sino que también tienen al menos un dominio funcional adicional. En una realización adicional, al menos un dominio funcional adicional es un dominio efector. Un "dominio efector" comprende un sitio de unión de un anticuerpo específico por una célula efectora, que puede estimular o provocar citotoxicidad, fagocitosis, presentación de antígenos, liberación de citocinas. Dichas células efectoras son, por ejemplo, pero no se limitan a, linfocitos T. En particular, el dominio efector comprende al menos un dominio de cadena pesada variable de anticuerpo y al menos un dominio de cadena ligera variable que forma un sitio de unión al antígeno para un antígeno en linfocitos T, tales como, por ejemplo, CD3 humano.

Así, en algunos aspectos, la proteína de unión a CD33 es multifuncional. El término multifuncional, como se usa en el presente documento, significa que una proteína de unión presenta dos o más funciones biológicas diferentes. Por ejemplo, las funciones biológicas diferentes son diferentes especificidades por diferentes antígenos. En ciertos casos, la proteína de unión a CD33 multifuncional es multispecífica, es decir, tiene especificidad de unión por CD33 y uno o más antígenos adicionales. En ciertos casos, la proteína de unión es biespecífica con especificidades por CD33 y CD3. Dichas proteínas de unión biespecíficas incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales biespecíficos de las clases IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, diacuerpos, diacuerpos de una sola cadena (scDb), Fv de una sola cadena en tándem (scFv)₂, por ejemplo enlazadores de linfocitos T biespecíficos (BiTE®), anticuerpos de reorientación de doble afinidad (DART™), diacuerpos en tándem (TandAb®) y flexicuerpos.

En ciertas realizaciones, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene especificidad por CD3 humano y, en algunos casos, CD3 de cangrejero. Los ejemplos de dicho sitio de unión son polipéptidos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VH de las secuencias mostradas en la Tabla 5 (SEQ ID NO: 64-67) y CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VL de la secuencia mostrada en la Tabla 6 (SEQ ID NO: 68-71). En ciertos casos, un sitio de unión a CD3 es la combinación del dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 64 y el dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 68. En ciertos casos, un sitio de unión a CD3 es la combinación del dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 65 y el dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 69. En ciertos casos, un sitio de unión a CD3 es la combinación del dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 66 y el dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 70. En ciertos casos, un sitio de unión a CD3 es la combinación del dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 67 y el dominio de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 71.

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de un dominio de cadena pesada variable anti-CD3 (las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada variable están en negrita y subrayadas)

Anti-CD3	Secuencia de dominio VH
SEQ ID NO: 64 CD3-01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>RIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSFYAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65 CD3-02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>RIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO: 66 CD3-03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>RIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO: 67 CD3-04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>RIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos de un dominio de cadena ligera variable anti-CD3 (las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera variable están en negrita y subrayadas)

Anti-CD3	Secuencia de dominio VL
SEQ ID NO: 68 CD3-01	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPKGKAPKALIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 69 CD3-02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPKGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 70 CD3-03	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPKGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK

Anti-CD3	Secuencia de dominio VL
SEQ ID NO: 71 CD3-04	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITFC <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQQKPKGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFSGLIGTDFLTITSSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK

En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1 de STYAMN (SEQ ID NO: 72). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR2 de RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR3 de HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR3 de HGNFGNSYVSYFAY (SEQ ID NO: 75). En aspectos aún adicionales, el sitio de unión a CD3 tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 72-74 respectivamente. En aspectos aún adicionales, el sitio de unión a CD3 tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 72, 73 y 75 respectivamente.

En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en NTYAMN (SEQ ID NO: 76), NTYAMH (SEQ ID NO: 77) y NKYAMN (SEQ ID NO: 78). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en RIRNKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 79), RIRNKYNNYATEYADSVKD (SEQ ID NO: 80), RIRSKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 81), RIRNKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 82), RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 83) y RIRSKYNNYATEYADSVKS (SEQ ID NO: 84). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 85), HGNFGNTYVSWFAY (SEQ ID NO: 86), HGNFGCSYVSWFAY (SEQ ID NO: 87), HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO: 88) y HGNFGNSYVSFFAY (SEQ ID NO: 89).

). En aspectos aún adicionales, el sitio de unión a CD3 tiene un dominio de cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 76, 73 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 79 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 80 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 81 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 82 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 83 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 72, 83 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 72, 83 y 85 respectivamente, SEQ ID NO: 76, 83 y 86 respectivamente, SEQ ID NO: 77, 83 y 74 respectivamente, SEQ ID NO: 72, 83 y 87 respectivamente, SEQ ID NO: 78, 73 y 88 respectivamente o SEQ ID NO: 78, 84 y 89 respectivamente.

En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDR1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDR2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 91). En aspectos adicionales, el sitio de unión a CD3 de una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene un dominio de cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDR3 de ALWYSNL (SEQ ID NO: 92). En aspectos aún adicionales, el sitio de unión a CD3 tiene un dominio de cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDR1, CD2 y CD3 de SEQ ID NO: 90-92 respectivamente.

En ciertos casos, el sitio de unión a CD3 tiene una alta afinidad por CD3. Alternativamente, en otros casos, la CDR1, CDR2, CDR3 del dominio de cadena pesada, así como el dominio de cadena ligera u, opcionalmente, los dominios de cadena ligera variable y dominios de cadena pesada variable, deriva de otros anticuerpos contra CD3, tales como, por ejemplo UCHT1, muromonab-CD3 (OKT3), otelixizumab (TRX4), teplizumab (MGA031), visilizumab (Nuvion) y similares.

En otro aspecto, en el presente documento se describen proteínas de unión a CD33, así como las proteínas de unión a CD33 y CD3 biespecíficas, que son humanizadas o completamente humanas, es decir, de origen humano.

Según la invención, una proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica tiene una de las combinaciones citadas en la reivindicación 1, que proporciona especificidad de CD33 y CD3 por dominios de cadena ligera y pesada variables para CD33 y CD3.

Variantes conservadas de secuencias de CDR y dominios de cadena pesada y ligera

En aspectos alternativos de la divulgación, los dominios de cadena pesada y ligera incorporan homólogos o variantes inmunológicamente activos de las secuencias de CDR descritas en el presente documento. Por consiguiente, en algunos aspectos de la divulgación, una secuencia de CDR en un dominio de cadena pesada o ligera que se une a

CD33 o CD3 es similar a, pero no idéntico a, la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 21-63 o 72-92. En ciertos casos, una secuencia de variante de CDR tiene una identidad de secuencia de 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % o 80 % en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 21-63 o 72-90 y que es inmunológicamente activa.

5 En casos adicionales, una secuencia de variante de CDR incorpora 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones de aminoácidos que sustituyen un aminoácido dado con otro aminoácido de características similares e incluyen además, entre los aminoácidos alifáticos, intercambio de alanina, valina, leucina e isoleucina; intercambio de los restos hidroxilo serina y treonina, intercambio de los restos ácidos aspartato y glutamato, sustitución entre los restos amida asparagina y glutamina, intercambio de los restos básicos lisina y arginina, y sustituciones entre los restos aromáticos fenilalanina y tirosina.

En otros casos más, una secuencia de variante de CDR incorpora sustituciones que potencian las propiedades de la CDR, tales como aumento en la estabilidad, resistencia a proteasas y/o afinidades de unión por CD33 o CD3.

15 En otros casos, una secuencia de variante de CDR se modifica para cambiar restos no críticos o restos en regiones no críticas. Los aminoácidos que no son críticos se pueden identificar por métodos conocidos, tales como maduración por afinidad, recorrido de CDR, mutagénesis dirigida al sitio, cristalización, resonancia magnética nuclear, marcado por fotoafinidad o mutagénesis de barrido de alanina.

20 En aspectos alternativos adicionales de la divulgación, las proteínas de unión a CD33 y CD3 comprenden dominios de cadena pesada y ligera que son homólogos o variantes inmunológicamente activos de secuencias de dominio de cadena pesada y ligera proporcionadas en el presente documento. Por consiguiente, en algunos aspectos de la divulgación, una proteína de unión a CD33 y CD3 comprende una secuencia de dominio de cadena pesada o ligera que es similar a, pero no idéntica a, la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1-20 o 64-71. En ciertos casos, una secuencia de dominio de cadena pesada o ligera de variante tiene una identidad de secuencia de 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % o 80 % en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1-20 o 64-71 y que es inmunológicamente activa.

25 En casos adicionales, una secuencia de dominio de cadena pesada o ligera de variante incorpora 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas incluyen sustituciones de aminoácidos que sustituyen un aminoácido dado con otro aminoácido de características similares e incluyen además, entre los aminoácidos alifáticos intercambio de alanina, valina, leucina e isoleucina; intercambio de los restos hidroxilo serina y treonina, intercambio de los restos ácidos aspartato y glutamato, sustitución entre los restos amida asparagina y glutamina, intercambio de los restos básicos lisina y arginina, y sustituciones entre los restos aromáticos fenilalanina y tirosina.

En otros casos más, una secuencia de dominio de cadena pesada o ligera de variante incorpora sustituciones que potencian las propiedades de la CDR, tales como aumento en la estabilidad, resistencia a proteasas y/o afinidades de unión por CD33 o CD3.

35 En otros casos, una secuencia de dominio de cadena pesada o ligera de variante se modifica para cambiar restos no críticos o restos en regiones no críticas. Los aminoácidos que no son críticos se pueden identificar por métodos conocidos, tales como maduración por afinidad, recorrido de CDR, mutagénesis dirigida al sitio, cristalización, resonancia magnética nuclear, marcado por fotoafinidad o mutagénesis de barrido de alanina.

Diacuerpos biespecíficos y en tándem de CD33 y CD3

40 En otro aspecto, una proteína de unión a CD33 o la proteína de unión a CD33 y CD3 biespecífica es un dímero, es decir, comprende dos polipéptidos con sitios de unión al antígeno para CD33 y CD3.

45 También se proporciona en el presente documento en otro aspecto una proteína de unión a CD33 y CD3 dimérica y biespecífica en el formato de un diacuerpo en tándem (TandAb®). Dichos diacuerpos en tándem se construyen uniendo cuatro dominios de unión variables del anticuerpo (dos dominios de cadena pesada variable (VH) y dos dominios de cadena ligera variable (VL) en una construcción génica única (Figura 1) que permite la homodimerización. En dichos diacuerpos en tándem, la longitud del conector es tal que previene el emparejamiento intramolecular de los dominios variables de manera que la molécula no se pueda plegar de nuevo en sí misma para formar un diacuerpo de una sola cadena, sino que más bien sea forzada a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena. Los dominios también están dispuestos de forma que los dominios VH y VL correspondientes se emparejen durante esta dimerización. Tras la expresión de una construcción génica única, dos cadenas de polipéptidos idénticas se pliegan cabeza con cola formando un homodímero funcional no covalente de aproximadamente 105 kDa (Figura 1). A pesar de la ausencia de enlaces covalentes intermoleculares, el homodímero es altamente estable una vez formado, sigue intacto y no vuelve a la forma monomérica.

55 Los diacuerpos en tándem tienen varias propiedades que proporcionan ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales tradicionales y otras moléculas biespecíficas más pequeñas. Los diacuerpos en tándem solo contienen dominios variables de anticuerpo y, por tanto, se contempla que carecen de efectos secundarios o interacciones no específicas que se puedan asociar con un resto Fc. Por ejemplo, los receptores de Fc que pueden unirse a dominios

Fc se encuentran en numerosos tipos de células, tales como glóbulos blancos (por ejemplo, basófilos, linfocitos B, eosinófilos, linfocitos citolíticos espontáneos, neutrófilos y similares) o células de Kuppfer. Debido a que los diacuerpos en tándem permiten la unión bivalente a cada uno de CD33 y CD3, la avidéz es la misma que la de una IgG. El tamaño de un diacuerpo en tándem, de aproximadamente 105 kDa, es más pequeño que el de una IgG, que puede permitir la penetración tumoral potenciada. Sin embargo, este tamaño está muy por encima del umbral renal para la depuración de primer paso, que ofrece una ventaja farmacocinética en comparación con formatos biespecíficos más pequeños basados en dominios de unión a anticuerpo o armazones no de anticuerpo. Además, los diacuerpos en tándem son ventajosos con respecto a otras proteínas de unión biespecífica, tales como moléculas BiTE o DART, basándose en estas propiedades farmacocinéticas y de avidéz que dan como resultado semividas intrínsecas más largas y rápida citotoxicidad. Los diacuerpos en tándem se expresan bien en células hospedadoras, por ejemplo, células CHO de mamífero. Se contempla que el sólido proceso de fabricación aguas arriba y aguas abajo está disponible para los diacuerpos en tándem.

Los diacuerpos en tándem biespecíficos de CD33 y CD3 descritos en el presente documento se diseñan para permitir el direccionamiento específico de células tumorales CD33⁺ reclutando linfocitos T citotóxicos. Esto mejora la ADCC (la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo) en comparación con los anticuerpos de longitud completa dirigidos a un único antígeno y que no son capaces de reclutar directamente linfocitos T citotóxicos. A diferencia, acoplando moléculas de CD3 expresadas específicamente en estas células, el diacuerpo en tándem puede reticular los linfocitos T citotóxicos con células tumorales CD33⁺ en un modo altamente específico, aumentando así significativamente el potencial citotóxico de dichas moléculas. Este mecanismo se expone brevemente en la Figura 2. El diacuerpo en tándem muestra ADCC fuerte, específica y eficiente. Se informa que los linfocitos T pueden desempeñar una función en controlar el crecimiento tumoral. Por ejemplo, se mostró que la presencia de linfocitos T citotóxicos en tumores colorrectales, así como ganglios linfáticos de pacientes con LNH, se correlacionaba con un mejor desenlace clínico. Además, se ha demostrado el potencial de las terapias diseñadas para inducir respuestas de linfocitos T para vacunas contra melanoma, así como el anticuerpo dirigido contra CTLA-4, un regulador negativo de la activación de linfocitos T. Los diacuerpos en tándem descritos en el presente documento se acoplan a linfocitos T citotóxicos por unión a CD3 expresado en la superficie, que forma parte del receptor de linfocitos T. La unión simultánea de este diacuerpo en tándem a CD3 y a CD33 expresada sobre la superficie de células tumorales particulares provoca la activación de linfocitos T y media en la posterior lisis de la célula tumoral (Figura 2).

Por tanto, en un aspecto adicional es un diacuerpo en tándem multiespecífico. En algunos aspectos, un diacuerpo en tándem multiespecífico tiene especificidades por dos, tres o más epítopes diferentes, en donde dos o más epítopes pueden ser de la misma diana de antígeno o de diferentes dianas de antígeno. En ciertas realizaciones, el diacuerpo en tándem multiespecífico es biespecífico y tetravalente, es decir, comprende cuatro sitios de unión al antígeno. Dicho diacuerpo en tándem biespecífico según la invención se une con dos sitios de unión al antígeno a CD3 humano y con otros dos sitios de unión al antígeno a CD33 humano, es decir, el diacuerpo en tándem se une bivalentemente a cada antígeno.

En algunos aspectos, un diacuerpo en tándem de unión al antígeno biespecífico es específico de CD33 humano y CD3 humano, en donde dicho diacuerpo en tándem comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, teniendo cada polipéptido al menos cuatro dominios de cadena variables unidos uno después del otro, en donde cada polipéptido comprende

- (i) un dominio de cadena pesada variable (VH) específico de CD33 humano;
- (ii) un dominio de cadena ligera variable (VL) específico de CD33 humano;
- (iii) un dominio VH específico de CD3 humano, y
- (iv) un dominio VL específico de CD3 humano.

En realizaciones particulares, un diacuerpo en tándem biespecífico se une específicamente a un epítipo de CD33 humano que está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano. En particular casos, dicho diacuerpo en tándem comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, teniendo cada polipéptido al menos cuatro dominios de cadena variables unidos uno después del otro, en donde cada polipéptido comprende

- (i) un dominio de cadena pesada variable específico de un epítipo de CD33 humano que está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano;
- (ii) un dominio de cadena ligera variable específico de un epítipo de CD33 humano que está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano;
- (iii) un dominio de cadena pesada variable específico de CD3 humano, y
- (iv) un dominio de cadena ligera variable específico de CD3 humano.

En otras realizaciones, en el presente documento se describen diacuerpos en tándem de CD33/CD3 que tienen una afinidad por CD33 en células CD33⁺ con una K_D de 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,5 nM o menos. Las células CD33⁺ se pueden seleccionar de células tumorales tales como, por ejemplo, HL-60 o KG-1.

5 En una realización adicional, un diacuerpo en tándem de CD33/CD3 descrito en el presente documento se une a CD3 y en ciertos casos a la cadena épsilon de CD3 en células CD3⁺, particularmente linfocitos T, con una K_D de 10 nM o menos, 5 nM o menos o 2 nM o menos.

Según la invención, cada polipéptido de un diacuerpo en tándem biespecífico comprende una de las siguientes combinaciones de los cuatro dominios de cadena variable: combinación (a)-(f) citada en la reivindicación 1.

10 Como se usa en el presente documento, "dímero" se refiere a un complejo de dos polipéptidos. En ciertas realizaciones, los dos polipéptidos se asocian no covalentemente entre sí, en particular con la condición de que no exista enlace covalente entre los dos polipéptidos. En ciertos casos, los dos polipéptidos tienen asociaciones covalentes, tales como enlaces disulfuro que se forman para ayudar en la estabilización del dímero. En ciertas realizaciones, el dímero es homodímero, es decir, comprende dos polipéptidos idénticos. El término "polipéptido" se refiere a un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces amida. El polipéptido es, en ciertos casos, una
15 proteína de fusión de una sola cadena, que no está ramificada. En el polipéptido, los dominios variables de anticuerpo se unen uno después del otro. El polipéptido, en otros casos, puede tener restos de aminoácidos contiguos, además de los restos de extremo N y/o extremo C de dominio variable. Por ejemplo, dichos restos de aminoácidos contiguos pueden comprender una secuencia de identificación, en algunos casos en el extremo C, que se contempla que es útil para la purificación y detección del polipéptido.

20 En un aspecto, cada polipéptido del diacuerpo en tándem biespecífico comprende cuatro dominios variables, una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) de una proteína de unión a CD3, así como una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) de una proteína de unión a CD33. En ciertos aspectos, se unen cuatro dominios variables por conectores peptídicos L1, L2 y L3 y en algunos casos se disponen desde el extremo N al C del siguiente modo:

25 Orden de dominios:

(1) VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); o

(2) VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); o

(3) VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); o

(4) VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

30 La longitud de los conectores influye en la flexibilidad del diacuerpo en tándem de unión al antígeno según estudios informados. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la longitud de los conectores peptídicos L1, L2 y L3 es tal que los dominios de un polipéptido se pueden asociar intermolecularmente con los dominios de otro polipéptido para formar el diacuerpo en tándem de unión al antígeno dimérico. En ciertas realizaciones, dichos conectores son "cortos", es decir, consisten en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 restos de aminoácidos. Así, en ciertos casos, los conectores
35 consisten en aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos. En el caso de 0 restos de aminoácidos, el conector es un enlace peptídico. Dichos conectores cortos favorecen la dimerización intermolecular de los dos polipéptidos por unión y formación de sitios de unión al antígeno correctos entre los dominios de cadena ligera variable del anticuerpo y los dominios de cadena pesada variable del anticuerpo de diferentes polipéptidos. El acortamiento del conector hasta aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos, en general, previene que dominios adyacentes de la misma
40 cadena de polipéptidos interaccionen intramolecularmente entre sí. En algunas realizaciones, estos conectores consisten en aproximadamente 3 a aproximadamente 10, por ejemplo 4, 5 o 6 restos de aminoácidos contiguos.

Con respecto a la composición de aminoácidos de los conectores, se seleccionan péptidos que no interfieren con la dimerización de los dos polipéptidos. Por ejemplo, los conectores que comprenden restos glicina y serina proporcionan, en general, resistencia a proteasas. La secuencia de aminoácidos de los conectores se puede optimizar,
45 por ejemplo, por métodos de presentación en fagos para mejorar la unión al antígeno y el rendimiento de producción del dímero de polipéptido de unión al antígeno. Los ejemplos de conectores peptídicos adecuados para un diacuerpo en tándem en algunas realizaciones son: GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97).

50 Los ejemplos no limitantes de los diacuerpos en tándem que se describen en el presente documento son los diacuerpos en tándem que tienen un dominio VL y VH anti-CD33, un dominio VL y VH anti-CD3, orden de dominios y conector según la Tabla 7.

Tabla 7: Diacuerpos en tándem CD33/CD3 a modo de ejemplo (TandAb)

Diacuerpo en tándem	Dominio anti-CD33		Dominio anti-CD3		Orden de dominios	Conector	
	VL	VH	VH	VL		L1/L3	L2
01	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
02	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
03	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
04	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
05	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG G <u>(SEQ ID NO: 97)</u>
06	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 69	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG G <u>(SEQ ID NO: 97)</u>
07	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG GS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>
08	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	3	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG GS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>
09	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 70	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
10	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 70	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
11	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 70	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
13	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 71	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
14	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>

Diacuerpo en tándem	Dominio anti-CD33		Dominio anti-CD3		Orden de dominios	Conector	
	VL	VH	VH	VL		L1/L3	L2
15	SEQ ID N O: 4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
16	SEQ ID N O: 5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
17	SEQ ID N O: 7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
18	SEQ ID N O: 7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	2	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
19	SEQ ID N O: 6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
20	SEQ ID N O: 6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 71	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
21	SEQ ID N O: 8	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
22	SEQ ID N O: 9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
23	SEQ ID N O: 9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 71	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>
24	SEQ ID N O: 10	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 68	1	GGSGGS <u>(SEQ ID NO: 95)</u>	GGSG <u>(SEQ ID NO: 96)</u>

En algunos aspectos de la divulgación,

5 un diacuerpo en tándem es el diacuerpo en tándem 01 (SEQ ID NO: 98), 02 (SEQ ID NO: 99), 03 (SEQ ID NO: 100), 04 (SEQ ID NO: 101), 05 (SEQ ID NO: 102), 06 (SEQ ID NO: 103), 07 (SEQ ID NO: 104), 08 (SEQ ID NO: 105), 09 (SEQ ID NO: 106), 10 (SEQ ID NO: 107), 11 (SEQ ID NO: 108), 12 (SEQ ID NO: 109), 13 (SEQ ID NO: 110), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 17 (SEQ ID NO: 114), 18 (SEQ ID NO: 115), 19 (SEQ ID NO: 116), 20 (SEQ ID NO: 117), 21 (SEQ ID NO: 118), 22 (SEQ ID NO: 119), 23 (SEQ ID NO: 120) o 24 (SEQ ID NO: 121) como se representa en la Figura 9B a 9Y.

10 La proteína de unión a CD33 y la proteína de unión a CD33/CD3 biespecífica (por ejemplo, diacuerpo en tándem biespecífico de CD33/CD3) descritas en el presente documento se produce, en algunas realizaciones, expresando polinucleótidos que codifican el polipéptido del diacuerpo en tándem que se asocia con otro polipéptido idéntico para formar el diacuerpo en tándem de unión al antígeno. Por tanto, otro aspecto es un polinucleótido, por ejemplo ADN o ARN, que codifica el polipéptido de un diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento.

15 El polinucleótido se construye por métodos conocidos, tales como combinando los genes que codifican al menos cuatro dominios variables de anticuerpo ya sean separados por conectores peptídicos o, en otras realizaciones, directamente unidos por un enlace peptídico, en una única construcción genética operativamente unida a un promotor adecuado, y opcionalmente un terminador de la transcripción adecuado, y que lo expresa en bacterias u otro sistema de expresión apropiado tal como, por ejemplo, células CHO. Dependiendo del sistema de vectores y el hospedador
20 utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen

promotores constitutivos e inducibles. El promotor se selecciona de forma que conduzca la expresión del polinucleótido en la célula hospedadora respectiva.

En algunos aspectos, el polinucleótido se inserta en un vector, preferentemente un vector de expresión, que representa un aspecto adicional. Este vector recombinante se puede construir según métodos conocidos.

- 5 Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedador para contener y expresar el polinucleótido que codifica el polipéptido del diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito. Los ejemplos de vectores de expresión para la expresión en *E. coli* son pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27) o pcDNA5 (Invitrogen) para la expresión en células de mamífero.

- 10 Así, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento, en algunos aspectos, se produce introduciendo un vector que codifica el polipéptido como se ha descrito anteriormente en una célula hospedadora y cultivando dicha célula hospedadora en condiciones por las cuales las cadenas de polipéptidos se expresan, se pueden aislar y, opcionalmente, purificar más.

- 15 En otros aspectos, la proteína de unión a CD33 o la proteína de unión a CD33/CD3 biespecífica (por ejemplo, diacuerpo en tándem biespecífico de CD33/CD3) descrita en el presente documento tiene una modificación. Las modificaciones típicas incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, fijación covalente de flavina, fijación covalente de un resto hemo, fijación covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, fijación covalente de un lípido o derivado de lípido, fijación covalente de fosfatidilinositol, conjugación de fármacos, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes con GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. En realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD33 o la proteína de unión a CD33/CD3 biespecífica se modifica con aminoácidos adicionales, tales como una secuencia conductora o secretora o una secuencia para la purificación del polipéptido.

- 25 En otros aspectos, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de unión a CD33, un diacuerpo en tándem de unión al antígeno, un vector que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido del diacuerpo en tándem de unión al antígeno o una célula hospedadora transformada por este vector y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los componentes y que no sea tóxico para el paciente al que se administra. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen disoluciones de solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles etc. Dichos vehículos se pueden formular por métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. Preferentemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede garantizar por la inclusión de diversos antibacterianos y antifúngicos.

- 40 Las proteínas de unión a CD33/CD3 biespecíficas con unión de alta afinidad a CD33 y CD3 son altamente activas en un gran número de especímenes primarios de LMA, sugiriendo que estas moléculas podrían ser activas contra LMA humana en todo el espectro de enfermedad citogenética/molecular, incluso en casos de expresión mínima de CD33. Es interesante que también se observa citotoxicidad específica de fármaco en presencia de linfocitos T autólogos residuales y aumenta significativamente mediante la adición de cantidades controladas de linfocitos T de donante sano (véase el Ejemplo 6).

- 45 Las proteínas de unión a CD33/CD3 biespecíficas, en particular los diacuerpos en tándem, pueden inducir la potente citólisis de células leucémicas CD33⁺ *in vitro*. Los datos indican que la unión de alta afinidad a tanto CD33 como CD3 maximiza la activación inducida por proteínas biespecíficas de linfocitos T y la eficacia anti-LMA. Las proteínas de unión biespecíficas dirigidas a CD33/CD3 de alta afinidad, tales como los diacuerpos en tándem descritos en el presente documento, muestran actividad citolítica en LMA primaria *in vitro*. Así, estas proteínas de unión biespecífica y los diacuerpos en tándem son adecuados para un enfoque terapéutico para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA) u otros tumores malignos hematológicos, por ejemplo, síndrome de displasia mieloide (SDM) o enfermedad mieloproliferativa (EMP).

- 55 Por tanto, en el presente documento se proporcionan métodos en donde el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento anteriormente se administra en una dosis eficaz a un sujeto, por ejemplo, un paciente, para el tratamiento de un cáncer CD33⁺ (por ejemplo leucemia mieloide aguda (LMA)), enfermedad o afección. Los cánceres CD33⁺ incluyen, pero no se limitan a, leucemias agudas tales como leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA) que incluye leucemia linfoblástica de precursores de linfocitos B, sarcoma mieloide, mieloma múltiple, linfomas agudos tales como linfoma linfoblástico agudo, leucemia mielomonocítica crónica y similares. Las enfermedades y afecciones de CD33⁺ incluyen estados inmunosupresores o entornos atribuidos por células supresoras derivadas de mieloide (CSDM) en ciertos cánceres e inflamación crónica.

En algunas realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA). En ciertas realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de un subtipo de leucemia mieloide aguda.

5 El sistema de clasificación franco-anglo-estadounidense divide la LMA en ocho subtipos: LMA-M0 (mínimamente diferenciada), LMA-M1 (sin maduración), LMA-M2 (con maduración granulocítica), LMA-M3 (leucemia promielocítica o promielocítica aguda), LMA-4 (leucemia mielomonocítica aguda), LMA-M5 (leucemia monoblástica aguda o monocítica), LMA-M6 (leucemia eritroide aguda) y LMA-M7 (leucemia megacarioblástica aguda). En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el
10 tratamiento de LMA-M0, LMA-M1, LMA-M2, LMA-M3, LMA-M4, LMA-M5, LMA-M6 o LMA-M7.

El esquema de clasificación de LMA de la OMS clasifica la LMA según los siguientes subtipos: LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, neoplasias mieloides relacionadas con la terapia, sarcoma mieloide, proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas y LMA no clasificada de otro modo. En ciertos otros casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, neoplasias mieloides relacionadas con la terapia, sarcoma mieloide, proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas o LMA no clasificada de otro modo.
15

En algunas otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de una LMA recién diagnosticada, recurrente o resistente al tratamiento.
20

En realizaciones adicionales, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de un trastorno de la sangre preleucémico tal como síndrome displásico mieloide (SDM) o enfermedad mieloproliferativa (EMP). En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de SDM. En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de EMP.
25

En otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de mieloma múltiple. En realizaciones adicionales, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para el tratamiento de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).
30

En otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para inhibir o eliminar células supresoras derivadas de mieloides (CSDM). Las CSDM expresan altamente en exceso CD33 en ciertos tejidos enfermos aislados y poseen fuertes actividades inmunosupresoras. En ciertos cánceres humanos (CD33⁺ así como no CD33⁺), las CSDM proliferan y se activan para suprimir respuestas CD4⁺ específicas de tumor de linfocitos T e inducir células T_{reg}, que permite que el tumor o cáncer florezca en un microentorno. En inflamación crónica, las CSDM se expanden supuestamente y se encuentran en sitios de inflamación para suprimir la función inmunitaria de linfocitos T. En otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para tratar una afección asociada a CSDM. En aún otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para tratar supresión inmunitaria. En aún otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para tratar inflamación suprimida por CSDM. En aún otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para tratar angiogénesis, invasión tumoral o metástasis de cánceres que son promovidos por CSDM. En aún otras realizaciones, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno como se describe en el presente documento se administra para tratar un cáncer o tumor que se potencia, incrementa, agrava o aumenta por CSDM.
35
40
45

El diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se contempla para su uso como un medicamento. La administración se efectúa por diferentes formas, por ejemplo por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En algunas realizaciones, la vía de administración depende del tipo de terapia y el tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. La pauta posológica será determinada por el médico adjunto y otros factores clínicos. Las dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el área superficial del cuerpo, edad, sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo de terapia, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades del principio activo que son suficientes para afectar la evolución y la intensidad de la enfermedad, que conducen a la reducción o remisión de dicha patología. Se puede determinar una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir LMA usando métodos conocidos.
50
55

En realizaciones adicionales, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con una terapia habitual para cánceres, enfermedades o afecciones CD33⁺. Las terapias habituales incluyen quimioterapias, inmunoterapias, terapias hormonales, radiación, cirugía, terapias génicas y

similares. En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con una terapia habitual para LMA. En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con citarabina, azacitidina, decitabina, una antraciclina (por ejemplo, daunorubicina, idarubicina, doxorubicina y similares), amsacrina, fludarabina, clofarabina, cladribina, nelarabina, metotrexato, bortezomib, carfilzomib, melfalán, ibrutinib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, apremilast, una epipodofilotoxina (por ejemplo, etopósido, tenipósido y similares), una antracenodiona (por ejemplo, mitoxantrona, pixantrona, losoxantrona, piroxantrona, ametantrona y similares), un agente anti-CD20 (por ejemplo, rituximab, ocrelizumab, ofatumumab o combinaciones de los mismos). En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con citarabina (ara-C). En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con azacitidina. En ciertos casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con decitabina. En casos adicionales, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con una antraciclina (por ejemplo, daunorubicina, idarubicina, doxorubicina y similares). En otros casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con un inhibidor del punto de regulación (por ejemplo, inhibidor de PD-1, inhibidor de CTLA-4 y similares). En aún otros casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con una epipodofilotoxina (por ejemplo, etopósido, tenipósido y similares). En aún otros casos, el diacuerpo en tándem de unión al antígeno descrito en el presente documento se administra en combinación con una antracenodiona (por ejemplo, mitoxantrona, pixantrona, losoxantrona, piroxantrona, ametantrona y similares).

Los siguientes ejemplos ilustran aún más las realizaciones descritas sin limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Clonación de construcciones de expresión de ADN que codifican anticuerpos Fv de una sola cadena

Para la expresión bacteriana de anticuerpos Fv de una sola cadena (scFv) anti-CD33 en *E. coli*, se clonaron secuencias codificantes de ADN de todas las moléculas en un vector de expresión bacteriano. Todas las construcciones de expresión se diseñaron para contener secuencias codificantes para un péptido señal de extremo N y marca de hexahistidina (6xHis) de extremo C (**SEQ ID NO: 122**) para facilitar la secreción de anticuerpos en el periplasma y la purificación, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VL y VH de todos los clones scFv anti-CD33 se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4.

Expresión de anticuerpos scFv anti-CD33 recombinantes en *E. coli*

Se expresaron anticuerpos scFv recombinantes como proteínas secretadas solubles en el periplasma de *E. coli*. En una primera etapa se inoculó un cultivo pequeño de medio complementado con ampicilina con bacterias transformadas y se incubó durante 16 h a 28 °C. Posteriormente, se ajustó la densidad óptica añadiendo un segundo medio complementado con ampicilina y se incubó una vez más a 28 °C hasta que se alcanzó una densidad óptica en el intervalo de 0,6 - 0,8 a 600 nm. Se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG 50 µM y la incubación de cultivos a 21-28 °C y 200 rpm durante hasta 16 h. Después de la incubación, se sedimentaron las células (30 min, 4 °C, 7500 rpm) y se guardaron a -20 °C hasta el posterior procesamiento.

Purificación de anticuerpos Fv de una sola cadena anti-CD33

Se extrajeron scFv recombinantes de periplasma de *E. coli* después de la centrifugación de cultivos de células bacterianas resuspendiendo sedimentos de células en tampón e incubación durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se sedimentaron las células y se mantuvieron los sobrenadantes que contenían las proteínas recombinantes. El procedimiento se repitió una vez más antes de que se reunieran los sobrenadantes y se homogeneizaran por ultrasonificación. Se diluyeron los homogeneizados, se complementaron con bajas concentraciones de imidazol y se cargaron en una columna de cromatografía de afinidad por metal (IMAC) inmovilizada previamente rellena (GE Healthcare). La columna se lavó hasta que se alcanzó el nivel inicial y entonces se eluyó la proteína unida con un tampón de imidazol. Se reunieron las fracciones que contenían el anticuerpo y posteriormente se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Finalmente, se concentraron los eluatos de proteína por ultrafiltración y se dializaron contra tampón de almacenamiento. Posterior al tratamiento a bajo pH (incubación a pH 3,0 durante 20-24 h a 37 °C), las muestras se neutralizaron usando Tris. Las proteínas purificadas se conservaron como alícuotas a -80 °C hasta uso.

EJEMPLO 2

Clonación de construcciones de expresión de ADN que codifican diacuerpos en tándem (TandAb®)

Para la expresión de diacuerpos en tándem biespecíficos en células CHO, se clonaron secuencias codificantes de todas las moléculas en un sistema de vector de expresión de mamífero. Se usaron los dominios de scFv anti-CD33 del Ejemplo 1 para construir diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en combinación con un dominio de scFv anti-CD3, con dominios organizados como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 3. En resumen, se sintetizaron y se subclonaron las secuencias de genes que codifican dominios VH y VL de anti-CD33 separados por un conector peptídico (VH-

conector-VL o VL-conector-VH). Se digirió la construcción resultante para generar secuencias codificantes de VH y VL separadas que utilizan un sitio de restricción Bam HI situado dentro de la secuencia conectora. Estos fragmentos VH y VL se ligaron entonces con un fragmento de ADN que codificaba los dominios VH y VL anti-CD3 (VH-conector-VL o VL-conector-VH) dando la construcción final. Las variantes de órdenes de dominios 1 a 3 de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 se muestran en la Figura 3. Todas las construcciones de expresión se diseñaron para contener secuencias codificantes para un péptido señal de extremo N y una marca de hexahistidina (6xHis) de extremo C (**SEQ ID NO: 122**) para facilitar la secreción y purificación de anticuerpos, respectivamente.

Expresión de los diacuerpos en tándem en células CHO transfectadas establemente

Se usó un sistema de expresión de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), un derivado de células de ovario de hámster chino CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao y Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968;60(4):1275-81). Las células adherentes se subcultivaron según protocolos habituales de cultivo celular proporcionados por Life Technologies.

Para la adaptación al crecimiento en suspensión, las células se desprendieron de los matraces de cultivo de tejido y se dispusieron en medio sin suero. Se criopreservaron las células adaptadas a la suspensión en medio con 10 % de DMSO.

Se generaron líneas celulares CHO recombinantes que expresan establemente diacuerpos en tándem secretados por transfección de células adaptadas a la suspensión. Durante la selección con el antibiótico higromicina B se midieron densidades celulares viables dos veces a la semana, y se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio de selección recién preparado a una densidad máxima de $0,1 \times 10^6$ células viables/mL. Se recuperaron conjuntos de células que expresan establemente los diacuerpos en tándem después de 2-3 semanas de selección, momento en el que las células se transfirieron a medio de cultivo habitual en matraces con agitación. Se confirmó la expresión de proteínas secretadas recombinantes realizando electroforesis en gel de proteína o citometría de flujo. Los conjuntos de células estables se criopreservaron en medio que contenía DMSO.

Se produjeron diacuerpos en tándem en los cultivos de 10 días de lotes alimentados de líneas celulares CHO transfectadas establemente por secreción en el sobrenadante de cultivo celular. Los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron después de 10 días a viabilidades de cultivo de normalmente >75 %. Las muestras se recogieron de los cultivos de producción cada dos días y se evaluaron la densidad celular y la viabilidad. En el día de la recogida, los sobrenadantes de cultivo celular se purificaron por centrifugación y filtración a vacío antes del uso posterior.

Se analizaron por SDS-PAGE la expresión de títulos de proteínas y la integridad de productos en sobrenadantes de cultivo celular.

Purificación de diacuerpos en tándem

Se purificaron los diacuerpos en tándem a partir de sobrenadantes de cultivo de células CHO en un procedimiento de dos etapas. Se sometieron las construcciones marcadas con His6 (**SEQ ID NO: 122**) a cromatografía en Superflow con Ni-NTA en una primera etapa, seguido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) preparativa en Superdex 200 en una segunda etapa. Se caracterizaron los diacuerpos en tándem eluidos con respecto a su contenido de homodímero (diacuerpo en tándem) y se reunieron si el contenido de homodímero era 90 % o más alto. Finalmente, se intercambiaron de tampón las muestras reunidas y se concentraron por ultrafiltración hasta una concentración típica de >1 mg/mL. Se evaluaron la pureza y la homogeneidad (normalmente >90 %) de las muestras finales por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, seguido por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-marca de His, así como por SEC analítica, respectivamente. Las proteínas purificadas se conservaron en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Se muestran polipéptidos de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en la Tabla 7 y la Figura 3. Cada diacuerpo en tándem consiste en dos polipéptidos idénticos (Figura 1). Ambos conectores L1 y L3 externos contuvieron seis aminoácidos GGSGGS (**SEQ ID NO: 95**), mientras que el conector peptídico central 2 varió en longitud (4-6 aminoácidos) con las secuencias GGSG (**SEQ ID NO: 96**), GGSGG (**SEQ ID NO: 97**) o GGSGGS (**SEQ ID NO: 95**), respectivamente.

Usando una serie de dominios variables anti-CD33 y dominios variables anti-CD3 se generó un gran número de moléculas de diacuerpo en tándem que podrían ser establemente producidas en líneas celulares transfectadas y que mantuvieron la estabilidad a temperatura corporal, así como después de los ciclos repetidos de congelación/descongelación. Para facilitar el posterior desarrollo y estudios de toxicología preclínica, se puso énfasis en la selección de moléculas de diacuerpo en tándem que mostraron unión a tanto CD33 humano como de macaco cangrejero. Se muestran ejemplos de secuencias de aminoácidos completas para la cadena sencilla de los diacuerpos en tándem 12 (**SEQ ID NO: 109**), 14 (**SEQ ID NO: 111**) y 16 (**SEQ ID NO: 113**) en las Figuras 9M, 9O y 9Q, respectivamente. En este ejemplo, el orden de los dominios variables y sus conectores para las estructuras es: VL (CD3)-L1-VH (CD33)-L2-VL (CD33)-L3-VH (CD3).

EJEMPLO 3

Determinación de la afinidad de anticuerpos por citometría de flujo

Se incubaron células con 100 μ L de diluciones sucesivas de diacuerpos en tándem de CD33/CD3. Después de lavar tres veces con tampón FACS, las células se incubaron con 0,1 mL de 10 μ g/mL de anticuerpo monoclonal anti-His de ratón en el mismo tampón durante 45 min sobre hielo. Después de un segundo ciclo de lavado, las células se incubaron con 0,1 mL de 15 μ g/mL de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugada con FITC en las mismas condiciones que antes. Como control, las células se incubaron con la IgG anti-His, seguido por los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugada con FITC sin diacuerpos en tándem anti-CD33. Entonces se lavaron nuevamente las células y se resuspendieron en 0,2 mL de tampón FACS que contenía 2 μ g/mL de yoduro de propidio (PI) para excluir células muertas. Se midió la fluorescencia de 1×10^4 células vivas usando un citómetro de flujo FC500 MPL de Beckman-Coulter usando el software MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) o un citómetro de flujo Guava EasyCyte de Millipore usando el software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemania). Se calcularon las intensidades medias de fluorescencia de las muestras de células usando el software CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) o el software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemania). Después de restar los valores de intensidad de fluorescencia de las células teñidas con los reactivos secundarios y terciarios solos, se usaron los valores para el cálculo de los valores de K_D con la ecuación para unión en un sitio (hipérbola) de GraphPad Prism (versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU.).

Se probaron los diacuerpos en tándem para sus afinidades de unión a células CD3⁺ y CD33⁺ humanas y células CD3⁺ y CD33⁺ de cangrejo. Los datos de unión a modo de ejemplo para los diacuerpos en tándem seleccionados se resumen en la Tabla 8:

Tabla 8: Características de unión a CD3 y CD33 de diacuerpos en tándem de CD33/CD3:

TandAb	K_D en linfocitos T [nM]	K_D en HL-60 [nM]	K_D en KG-1 [nM]	K_D en U-937 [nM]	Relación de K_D CD33cangr/CD33hu	CE_{50} en HL-60 [pM]
01	94,2	0,6	0,9	7,1	0,7	1,9
02	69,8	0,2	0,3	0,9	1,1	0,5
03	81,9	1,1	1,8	8,9	0,6	3,6
04	79,3	0,5	0,5	1,7	1,1	1,8
05	69,5	1,0	1,2	6,2	0,8	2,7
06	86,3	0,4	0,5	1,6	0,8	1,6
07	49,7	13,7	47,9	47,1	45,8	17,8
08	2,4	0,3	0,5	1,8	0,6	1,8
09	2,4	0,5	0,3	2,2	1,0	6,8
10	1,9	0,5	1,0	1,7	0,8	7,0
11	2,6	0,3	0,5	0,6	1,2	5,9
12	1,5	0,3	0,9	0,5	1,7	1,3
13	55,7	0,2	0,3	0,5	1,6	1,1
14	2,1	0,3	0,3	1,2	1,0	1,6
15	1,3	0,4	0,3	0,9	1,1	1,8
16	2,1	0,3	0,2	0,3	1,4	1,5
17	3,3	5,0	52,5	24,4	1,9	18,4
18	1,9	3,4	16,3	15,1	3,1	6,3
19	6,3	2,8	3,6	5,4	37,3	5,7
20	143,8	4,1	7,0	7,2	33,8	10,0
21	2,1	9,7	25,1	80,2	0,9	7,6

TandAb	K _D en linfocitos T [nM]	K _D en HL-60 [nM]	K _D en KG-1 [nM]	K _D en U-937 [nM]	Relación de K _D CD33cangr/ CD33hu	CE ₅₀ en HL-60 [pM]
22	4,1	0,7	2,0	8,6	0,6	3,2
23	97,2	0,4	1,0	5,1	1,9	2,8
24	2,3	5,6	12,4	39,5	1,8	9,6

#Se calculó la relación de K_D CD33 cangrejero / CD33 humano basándose en los valores de K_D medidos en células CHO que expresan CD33 de cangrejero y CD33 humano, respectivamente. † Se calculó la relación de K_D CD3 hu / CD33 hu basándose en los valores de K_D medidos en células Jurkat (CD3hu) y las K_D medias de tres líneas de células tumorales CD33⁺ humanas (HL-60, KG-1, U937).

Se evaluó la afinidad de unión a CD3 y la reactividad cruzada en los experimentos de valoración y de citometría de flujo en células Jurkat CD3⁺ (proporcionadas por Dr. Moldenhauer, DKFZ Heidelberg; leucemia aguda humana de linfocitos T) y la línea celular HSC-F CD3⁺ de cangrejero (JCRB, cat.:JCRB1164). Se evaluó la unión a CD33 y la reactividad cruzada en las líneas de células tumorales CD33⁺ humanas: HL-60 (DSMZ, cat.: ACC 3, leucemia humana de precursores de linfocitos B), U-937 (DSMZ, cat.: ACC5; linfoma histiocítico humano) y KG-1 (DSMZ, cat.:ACC14; leucemia mieloide aguda). Se calculó la relación de K_D de reactividad cruzada usando los valores de K_D determinados en las líneas celulares CHO que expresan o antígenos humanos recombinantes o de cangrejero recombinantes.

Los diacuerpos en tándem presentaron una afinidad relativamente alta por CD33⁺ humano en la mayoría de las líneas de células tumorales probadas por debajo de 1 nM. Se determinó que las afinidades por CD3 humano eran iguales o inferiores a 2 nM.

EJEMPLO 4

Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad, se recogieron células diana cultivadas en condiciones normales, se lavaron y se resuspendieron en diluyente C, proporcionado en el minikit PKH67 Green Fluorescent Cell Linker, a una densidad de 2x10⁷ células/mL. Entonces se mezcló la suspensión de células con un volumen igual de una disolución de marcado de PKH67 doblemente concentrada y se incubó durante 2-5 min a TA. Se realizó la reacción de tinción añadiendo un volumen igual de FCS e incubando durante 1 min. Después de lavar las células diana marcadas con medio completo RPMI, se contaron las células y se resuspendieron hasta una densidad de 2x10⁵ células/mL en medio completo RPMI. Entonces se sembraron 2x10⁴ células diana junto con linfocitos T humanos enriquecidos como células efectoras en una relación E:D de 5:1, en presencia de concentraciones crecientes de los diacuerpos en tándem indicados en pocillos individuales de una placa de microtitulación, en un volumen total de 200 µL/pocillo. Se determinó la muerte celular espontánea y la destrucción de dianas por linfocitos T en ausencia de anticuerpos para al menos tres duplicados en cada placa. Después de la centrifugación, las placas de ensayo se incubaron durante los periodos de tiempo indicados a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Después de la incubación, los cultivos se lavaron una vez con tampón FACS y luego se resuspendieron en 150 µL de tampón FACS complementado con 2 µg/mL de PI. Se midió la cantidad absoluta de células diana vivas por una tinción verde positiva con PKH67 y tinción negativa para PI usando un citómetro de flujo FC500 MPL de Beckman-Coulter (Beckman-Coulter) o un citómetro de flujo Guava EasyCyte de Millipore (Merck Millipore). Basándose en las células diana vivas restantes medidas, se calculó el porcentaje de lisis celular específica según la siguiente fórmula: $[1 - (\text{número de dianas vivas}_{\text{(muestra)}} / \text{número de dianas vivas}_{\text{(espontáneas)}})] \times 100 \%$. Se calcularon las curvas sigmoides de respuesta a dosis y los valores de CE₅₀ por regresión no lineal/ajuste logístico de 4 parámetros usando el software GraphPad. Se usaron los valores de lisis obtenidos para una concentración dada de anticuerpo para calcular las curvas sigmoides de dosis-respuesta por análisis de ajuste logístico de 4 parámetros usando el software Prism.

Se determinaron valores de CE₅₀ en el ensayo de 20-24 horas en células diana U-937 CD33⁺ (DSMZ, cat.: ACC5; linfoma histiocítico humano) con linfocitos T humanos enriquecidos como células efectoras a una relación de 5:1. También se probaron algunos de los diacuerpos en tándem en ensayos de citotoxicidad en células diana KG-1 CD33⁺ (DSMZ, cat.:ACC14; leucemia mieloide aguda) y HL-60. Específicamente, se eligieron células HL-60 como modelo de una LMA con expresión de la superficie celular relativamente alta de CD33 (IMF arbitraria [media ± EEM]: 3,133 ± 215; n=3), y se eligió KG-1 a como modelo de una LMA con expresión de CD33 muy limitada (IMF arbitraria: 277 ± 11; n=3). Los datos de citotoxicidad a modo de ejemplo para diacuerpos en tándem seleccionados se resumen en la Tabla 9. Los datos de citotoxicidad adicionales para las líneas celulares HL-60 se encuentran en la Tabla 8, última columna.

Tabla 9: Potencia *in vitro* de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en diferentes líneas de células tumorales CD33⁺:

Diacuerpo en tándem	CE ₅₀ [pM (pg/mL)] en líneas celulares diana CD33+ humanas							
	HL-60		U-937		KG-1		media	
12	1,3	(137)	0,8	(84)	1,2	(126)	1,1	(116)
14	1,6	(168)	3,6	(378)	2,6	(273)	2,6	(273)
16	1,5	(158)	1,9	(200)	1,8	(189)	1,7	(179)

Se determinaron los valores de CE₅₀ en ensayos de citotoxicidad basada en FACS con linfocitos T humanos primarios como células efectoras en una relación E:D de 5:1 en las líneas celulares diana indicadas incubadas durante 20-24 horas. Se probó cada diacuerpo en tándem en cada línea de células tumorales en al menos dos experimentos independientes. Se presentan valores medios.

EJEMPLO 5

Experimentos de cribado de citotoxicidad adicional en líneas celulares de LMA CD33+ humanas en 48 horas

Como se ha descrito anteriormente, ya se detectó citotoxicidad significativa a las 24 horas; sin embargo, se pueden detectar niveles de toxicidad más altos a las 48 horas. Para los ensayos posteriores, se eligió un momento de tiempo de 48 horas. Se probó el impacto de la selección de linfocitos T sobre la citotoxicidad inducida por diacuerpos en tándem. Para realizar esto, se obtuvieron CMSP sin estimular de un donante voluntario sano, y se aislaron células CD3+ tanto por "enriquecimiento positivo" simple por uso de microperlas CD3, así como por "selección negativa" más compleja por una mezcla de microperlas de anticuerpos contra CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 y CD235a. Como se representa en la Figura 4, la citotoxicidad inducida por diacuerpos en tándem fue mayor con linfocitos T de donante sano negativamente seleccionados que con los linfocitos T positivamente seleccionados. Sin embargo, las actividades citotóxicas relativas de los diacuerpos en tándem individuales no se afectaron por el método de selección de linfocitos T. Por tanto, se realizaron ensayos posteriores con linfocitos T de donante sano positivamente enriquecidos.

Se recogieron células mononucleares no estimuladas de voluntarios adultos sanos por leucaféresis en el Centro de procesamiento de células hematopoyéticas (Centro de excelencia) del Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson (FHCRC) siguiendo los protocolos de investigación autorizados por el Comité de ética médica de FHCRC. Se enriquecieron los linfocitos T mediante clasificación de células magnética por o microperlas CD3 ("enriquecimiento positivo") o por el kit Pan T-Cell Isolation ("selección negativa"; ambos de Miltenyi Biotec, Auburn, CA), y luego se congelaron en alícuotas y se conservaron en nitrógeno líquido. Se marcaron alícuotas de células descongeladas con CellVue Burgundy 3 µM (eBioscience, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. Se cultivaron CMSP purificadas en presencia de diversas concentraciones de moléculas de diacuerpo en tándem.

Para la cuantificación de la citotoxicidad inducida por fármaco, se incubaron células a 37 °C (en 5 % de CO₂ y aire), como en el Ejemplo 4, a diferentes relaciones de células E:D. Después de 24-72 horas, se determinaron los números de células y la citotoxicidad inducida por fármaco, usando DAPI para detectar células no viables, usando un citómetro LSRII (BD Biosciences) y se analizaron con FlowJo. Se identificaron células de LMA por propiedades de dispersión hacia adelante/lateral y, en experimentos donde se añadieron linfocitos T de donante sano, negatividad para el colorante CellVue Burgundy (Figura 5). La citotoxicidad específica inducida por fármaco se presenta como: % de citotoxicidad = 100 x (1 - células diana vivas_{tratadas}/células diana vivas_{control}). Los resultados de los ensayos de citotoxicidad se presentan como valores medios ± error estándar de la media (EEM). Se usó correlación no paramétrica de Spearman para calcular las correlaciones entre características de muestras continuas. Todos los valores de la p son bilaterales. Se realizaron análisis estadísticos usando el software GraphPad Prism.

En ausencia de linfocitos T de donante sano, ninguno de los diacuerpos en tándem de CD33/CD3 ejerció efecto citotóxico perceptible sobre las líneas celulares de LMA en ausencia de linfocitos T, confirmando el requisito absoluto de linfocitos T para sus efectos citotóxicos (datos no mostrados). En presencia de linfocitos T, el grado de citotoxicidad específica inducida por diacuerpos en tándem dependió de la concentración del diacuerpo en tándem, así como de la relación de células E:D. Las comparaciones directas entre las moléculas de diacuerpo en tándem dirigido a CD33/CD3 y un diacuerpo en tándem de control (00) indicaron diferencias considerables en la citotoxicidad inducida por anticuerpo en tanto las células HL-60 (Figura 6A/B y Tabla 10) como las células KG-1a (Figura 6C/D y Tabla 10), siendo los resultados altamente reproducibles en experimentos repetidos. En general, el grado de citotoxicidad inducida por diacuerpos en tándem se correlacionó con la afinidad de unión para CD3 en linfocitos T humanos primarios (para citotoxicidad en células KG-1a a 25 pM (aprox. 2,5 ng/mL) y E:D=5:1: r=-0,542, p=0,009; para citotoxicidad en células HL-60 a 25 pM y E:D=5:1: r=-0,391, p=0,07). Los diacuerpos en tándem 12, 14, 16 fueron altamente citotóxicos para tanto las células HL-60 como KG-1a.

TABLA 10: Inducción y citotoxicidad de CD25 y CD69 a las 48 h de diacuerpos en tándem de CD33/CD3

Diacuerpo en tándem ¹	K _D CD3 (nM) Linfocitos T humanos	K _D CD33 (nM) Células HL-60	Inducción de CD25 CE ₅₀ (pM) ²	Inducción de CD69 CE ₅₀ (pM) ²	Proliferación de linfocitos T en CMSP CE ₅₀ (pM) ³	Citotoxicidad células HL-60 (% ± EEM) ⁴	Citotoxicidad células KG-1a (% ± EEM) ⁴
15	1,3	0,4	6	7	7	82,9 ± 3,7	80,2 ± 1,9
12	1,5	0,3	6	3	2	84,7 ± 2,3	85,6 ± 1,6
10	1,9	0,5	10	6	6	48,0 ± 2,4	78,6 ± 2,3
14	2,1	0,3	10	7	6	86,0 ± 0,4	69,8 ± 5,7
21	2,1	9,7	ND	225	500	12,4 ± 1,0	0,0 ± 0,2
24	2,3	5,6	ND	57	264	24,5 ± 1,9	1,1 ± 0,2
09	2,4	0,5	11	7	9	43,2 ± 15,8	74,6 ± 3,2
11	2,6	0,3	11	5	6	52,7 ± 8,1	84,7 ± 1,4
17	3,3	5,0	30	114	30	4,2 ± 0,2	0,7 ± 0,4
22	4,1	0,7	10	4	7	74,2 ± 7,4	44,4 ± 5,3
16	5,1	0,3	1	2	3	86,0 ± 1,4	81,3 ± 1,5
19	6,3	2,8	9	5	6	79,4 ± 3,5	83,8 ± 2,9
07	49,7	13,7	134	65	50	6,3 ± 3,3	2,1 ± 0,7
13	55,7	0,2	30	22	23	70,4 ± 2,5	1,3 ± 0,4
05	69,5	1	116	74	74	23,8 ± 6,9	0,3 ± 0,3
02	69,8	0,2	42	27	4	80,9 ± 3,6	4,6 ± 2,1
04	79,3	0,5	94	62	44	24,1 ± 4,0	0,7 ± 0,8
03	81,9	1,1	117	87	63	13,1 ± 3,6	0,0 ± 0,5
06	86,3	0,4	39	21	48	45,7 ± 6,4	1,4 ± 0,2
01	94,2	0,6	92	91	89	8,0 ± 1,6	0,4 ± 0,4
23	97,2	0,4	41	17	37	73,7 ± 2,6	1,5 ± 0,3
20	143,8	4,1	98	75	38	31,2 ± 3,9	1,1 ± 0,3

¹ Los diacuerpos en tándem (TandAb) se enumeran en orden de afinidad de CD3 decreciente.

² Se midió la inducción de CD25 y CD69 después de 24 horas en cultivos de CMSP sin fraccionar.

³ Proliferación de linfocitos T inducida por diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en CMSP sin fraccionar con células CD33+ presentes.

⁴ Citotoxicidad (%) después de 48 horas de células DAPI+ en una concentración de diacuerpos en tándem de 25 pM en presencia de linfocitos T de donante sano en una relación células E:D de 5:1 de 3 experimentos independientes realizados en pocillos duplicados.

ND: sin activación detectable de CD25

EJEMPLO 6Caracterización adicional de diacuerpos en tándem en especímenes de LMA humana primaria

Para una caracterización exhaustiva de las propiedades citotóxicas de estos candidatos, se obtuvieron especímenes de pacientes con LMA para los estudios de un depósito de especímenes de FHCRC.

- 5 Se obtuvieron alícuotas congeladas de células mononucleares aisladas por Ficoll de especímenes de sangre periférica o de médula ósea pretratamiento ("diagnóstico") de pacientes adultos con LMA de depósitos de FHCRC. Los presentes inventores usaron los criterios de la OMS de 2008 para definir LMA (Vardiman et al.; Blood. 2009; 114(5):937-951) y los criterios mejorados del Consejo de Investigación Médica (MRC) del Reino Unido para asignar riesgo citogenético (Grimwalde et al.; Blood. 2010; 116(3):354-365). Los pacientes proporcionaron el consentimiento informado por escrito para la recogida y el uso de sus bioespecímenes para fines de investigación siguiendo los protocolos autorizados por el Comité de ética médica de FHCRC. Se desidentificaron los datos clínicos en cumplimiento de las normas de la Ley de Transferencia y Responsabilidad de Seguro Médico. Después de la descongelación, las células se tiñeron con anticuerpos directamente marcados que reconocían CD33 (clon P67.6; conjugado con PE-Cy7), CD3 (clon SK7; conjugado con PerCP), CD34 (clon 8G12; conjugado con APC; todos de BD Biosciences, San Jose, CA) y CD45 (clon HI30; conjugado con APC-eFluor®780; eBioscience). Para identificar células no viables, se tiñeron las muestras con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se adquirieron al menos 10.000 acontecimientos en un citómetro de flujo Canto II (BD Biosciences), y se analizaron las células con DAPI usando FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

- Después de la descongelación, los especímenes tuvieron >58 % de blastos de LMA, como se ha determinado por citometría de flujo basada en las propiedades de CD45/dispersión lateral. Los especímenes tuvieron >50 % de células viables inmediatamente después de la descongelación y >50 % de células viables después de 48 horas en cultivo líquido que contiene citocinas (Figura 7). La mediana de la edad de los pacientes fue 58,1 (intervalo: 23,9-76,2) años; el riesgo de enfermedad citogenética fue favorable en 2, intermedio en 18 y adverso en 7. La información sobre el estado de mutación de *NPM1*, *FLT3* y *CEBPA* fue incompleta; sin embargo, se sabía que una muestra era *CEBPA*^{doble-mutante}, y otra muestra era *NPM1*^{pos}/*FLT3-ITD*^{neg}. La mediana del porcentaje de blastos mieloides y linfocitos T CD3⁺ en los especímenes estudiados fue 86,1 % (intervalo: 58,4-97,0 %) y 2,0 % (intervalo: 0-11,9 %), respectivamente, y la mediana de la viabilidad de las muestras después de 48 horas en cultivo fue 80,1 % (intervalo: 53,6-93,6 %). Quince de los pacientes tuvieron LMA recién diagnosticada, mientras que 12 o tuvieron enfermedad recidivante (n=7) o resistente al tratamiento (n=5) en el momento de la recogida de especímenes. Como se resume en la Tabla 11, las características básicas de los especímenes de los pacientes con LMA recién diagnosticada fueron similares a las de aquellos con enfermedad recidivante/resistente al tratamiento con respecto a la expresión de CD33 en blastos mieloides, cantidad de linfocitos T autólogos, proporción de blastos mieloides y viabilidad del cultivo.

- La adición de moléculas del diacuerpo en tándem a los cultivos de especímenes de LMA produjo citotoxicidad modesta, dependiente de la dosis (Figura 8A), que demostró que los linfocitos T autólogos, contenidos en los especímenes de pacientes con LMA activa, se pueden acoplar a la lisis de células leucémicas. En presencia de linfocitos T de donante sano, la actividad citotóxica de diacuerpos en tándem individuales fue estrictamente dependiente de la dosis de fármaco y la relación de células E:D (Figura 8B/C). Sin embargo, se observó alta actividad de los diacuerpos en tándem incluso en algunos especímenes con expresión muy baja de CD33 en blastos de LMA. Entre las moléculas de diacuerpo en tándem, pareció que 12 eran los más activos, puesto que tuvieron la citotoxicidad más alta a bajas concentraciones (2,5 pM (aprox. 250 ng/mL) y, a un grado menos pronunciado, también 10 pM (aprox. 1 ng/mL)) a tanto E:D=1:3 como E:D=1:1.

- Se han seleccionado diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en muestras de sangre de pacientes con LMA representativos, que variaron en términos de sexo del paciente, edad, estadio de enfermedad (recién diagnosticada, recidivante, resistente al tratamiento), grado de expresión de CD33 y riesgo citogénico (Tabla 11). Sorprendentemente, varios diacuerpos en tándem examinados (por ejemplo, 02, 08, 09, 11, 12, 14, 16, 19, 22 y 23) fueron altamente activos en casi todas las muestras de paciente en el espectro de enfermedades que se muestra en la Figura 15. Además, el grado y el alcance de la actividad son similares en todos los estadios de LMA, que incluye pacientes recién diagnosticados, recidivantes y resistentes al tratamiento.

TABLA 11. Características de especímenes primarios de LMA

	Todos los pacientes (n=27)	LMA recién diagnosticada (n=15)	LMA recidivante/resistente al tratamiento (n=12)
Mediana de la edad (intervalo), años	58,1 (23,9-76,2)	64,0 (40,2-76,2)	44,4 (23,9-67,4)
Riesgo citogenético/molecular			
Favorable	2	2	--
Intermedio	18	10	8
<i>CEBPA</i> ^{doble-mutante}	1	1	--
<i>NPM1</i> ^{pos} / <i>FLT3-ITD</i> ^{neg}	1	--	1
<i>NPM1</i> ^{pos} / <i>FLT3-ITD</i> ^{pos} o <i>NPM1</i> ^{neg} / <i>FLT3-ITD</i> ^{pos}	10	5	5
Adverso	7	3	4
Fuente del espécimen			
Médula ósea	11	4	7
Sangre periférica	16	11	5
Mediana de % de blastos (intervalo)	86,1 (58,4-97,0)	86,1 (66,7-95,5)	86,7 (58,4-97,0)
Mediana de expresión de CD33 en blastos (intervalo)	849 (5-5,356)	849 (5-5,356)	788 (7-2,242)
Mediana de % de linfocitos T (intervalo)	2,0 (0-11,9)	1,6 (0-11,9)	2,1 (0,7-8,7)
Mediana de % de viabilidad a las 48 horas (intervalo)	80,1 (53,6-93,6)	76,0 (53,6-93,6)	83,5 (63,9-93,1)

EJEMPLO 7

5 Potencia y eficacia del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 12 y el diacuerpo en tándem 16 sobre diferentes líneas celulares CD33⁺ de diverso origen que expresan diferentes niveles de CD33

Para evaluar si la potencia y la eficacia de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 dependen de la densidad de CD33 en las células diana, se probaron diversas líneas de células tumorales CD33⁺ humanas y células CHO que expresaban CD33 humanas recombinante para sus niveles de expresión de CD33 usando el kit de cuantificación QIFIKIT y el mAb anti-CD33 WM53. Los resultados en la Tabla 12 muestran que las densidades de CD33 en las líneas de células tumorales estuvieron en el intervalo entre ~1300 CUAN (capacidad de unión a anticuerpos normalizada) y ~46000 CUAN. La expresión en células CHO-CD33 fue ~197000 CUAN, sustancialmente superior a en las líneas de células tumorales. Todas las líneas celulares CD33⁺ probadas se usaron como células diana en al menos 3 ensayos de citotoxicidad basados en FACS independientes con linfocitos T humanos como células efectoras a una relación entre efectoras y diana de 5:1 en presencia de diluciones sucesivas del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 12 y el diacuerpo en tándem 16. En cada ensayo, se calcularon los valores de CE₅₀ y de lisis medida por diacuerpos en tándem por regresión no lineal. Los resultados demuestran que ni la potencia (valores de CE₅₀) ni la eficacia (% de lisis) de 12 y 16 se correlaciona con la densidad de CD33 sobre la superficie de células diana.

Notablemente, al menos 12 y 16 presentan su actividad citotóxica también contra células como SEM con densidades de CD33 muy bajas inferiores a 1500 CUAN.

20

Tabla 12: Expresión superficial de células diana CD33 y potencia citotóxica del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 12 y el diacuerpo en tándem 16:

Línea celular	Densidad de CD33 [CUAN]		12		16	
			CE ₅₀ [pM]		CE ₅₀ [pM]	
	media	DE	media	DE	media	DE
CHO-CD33	196990	28053	11,8	11,2	24,0	19,5
HL-60	45948	4478	1,4	0,5	1,6	0,4
KG-1	42828	6923	1,0	0,6	1,9	2,0
KASUMI-1	25922	6484	1,3	0,6	2,4	1,4
THP-1	22065	415	1,9	0,2	6,0	1,2
RPMI-8226	19931	2604	14,0	17,8	2,8	2,0
U-937	17669	4593	0,9	0,1	1,3	0,6
K562	13789	2156	4,5	1,3	4,8	2,7
BV-173	8518	1231	1,4	0,6	3,2	1,6
SEM	1306	144,2	2,2	0,5	5,1	3,0

5 Se determinó la capacidad de unión a anticuerpos normalizada (CUAN) en líneas celulares CD33⁺ usando QIFIKIT y el mAb anti-CD33 WM53. Se determinaron los valores de CE₅₀ para la lisis de células diana redirigida por el diacuerpo en tándem 12 y el diacuerpo en tándem 16 en ensayos de citotoxicidad basados en FACS con linfocitos T primarios humanos como células efectoras en relaciones E:D de 5:1 y 20-24 h de incubación; se incubaron los ensayos con células CHO que expresan CD33 durante 40-48 h. Se muestran la media y la DE de al menos 3 ensayos independientes.

10 EJEMPLO 8

Activación por TandAb de linfocitos T y destrucción *in vitro* de células de LMA

Se incubaron TandAb con linfocitos T humanos purificados y una línea celular de leucemia humana CD33⁺ marcada con VPD-450, KG-1, o la línea celular de LLA humana CD33⁺, G2 (E:D 5:1). Se usó citometría de flujo para evaluar la lisis de células diana por TandAb (10⁻¹⁵ a 10⁻⁸ M; 24 h, 37 °C).

15 La incubación de TandAb 12, 16 y 19 con linfocitos T humanos lisó eficientemente las células KG-1 (CI50 ~ 0,01, 0,5 y 5 pM respectivamente). Se activaron hasta 40 % de linfocitos T (CD25⁺), aumentando con la actividad citotóxica. Un TandAb de control con una diana irrelevante, 00 (>10⁻⁷ M), no dio como resultado destrucción significativa de KG-1 *in vitro*. Por separado, 16 indujo la lisis de células KG-1 (CI50 = 5 x 10⁻¹² M), mientras que 1 x 10⁻⁸ M no tuvo efecto sobre las células CD33-G2. Los resultados indican que los linfocitos T se activan y lisan potentemente las células tumorales cuando se dirigen a células leucémicas CD33⁺ (KG-1) y blastos CD33⁺ primarios de LMA por TandAb de CD33/CD3.

20 EJEMPLO 9

Mapeo de epítopes

Se sometieron a mapeo de epítopes diacuerpos en tándem que contienen diferentes restos de unión a CD33 usando tecnología CLIPS (Pepscan) para identificar epítopes que se unen a CD33.

25 La tecnología CLIPS facilita la estructuración de péptidos en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, pliegues de tipo lámina, pliegues de tipo hélice y combinaciones de los mismos, ofreciendo la posibilidad de mapear epítopes discontinuos de la molécula diana.

Se sintetizó una matriz de más de 7000 péptidos independientes y la unión de cada anticuerpo a los péptidos se probó en un ELISA.

30 Los diacuerpos en tándem 12, 14, 16 y 22 se unen a la extensión ⁶²DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) en el primer dominio de tipo Ig de CD33 humano. Las extensiones de aminoácidos respectivas se muestran subrayadas y en negrita en la Figura 9A. Se contempla que los diacuerpos en tándem 01, 02, 04, 06, 08, 09, 13 y 23 también se unen

a este epítotope, ya que estos diacuerpos en tándem comparten los mismos dominios de unión a CD33 (SEQ ID NO: 2 y 12, 3 y 13, 5 y 15, 9 y 19) que los diacuerpos en tándem 12, 14 16 y 12.

EJEMPLO 10

Dosis-respuesta en un modelo de tumor profiláctico *in vivo*

5 Se comparan los diacuerpos en tándem 12 y 16 en diferentes niveles de dosis en un modelo de xenoinjerto de tumor HL-60 profiláctico en ratones NOD/scid reconstituídos con linfocitos T humanos. Para lograr una dosis-respuesta, se seleccionaron tres niveles de dosis a 10, 1 y 0,1 µg (0,5, 0,05 y 0,005 mg/kg).

10 Se xenotrasplantaron ocho grupos experimentales de ratones NOD/scid inmunodeficientes por inyección subcutánea con una suspensión de 4x10⁶ células HL-60. Antes de la inyección, las células se mezclaron con 3x10⁶ linfocitos T aislados de capas leucocíticas (donantes sanos) empleando selección negativa. Para explicar la posible variabilidad entre donantes de los linfocitos T, se subdividió cada uno de los grupos experimentales en tres cohortes que recibió cada una linfocitos T de un donante individual solo. Todos los animales de los grupos experimentales trasplantados con células tumorales y linfocitos T recibieron un bolo intravenoso en los días 0, 1, 2, 3 y 4 (qdx5) de o vehículo (control) o 16 o 12 en tres niveles de dosis diferentes como se indica (0,1 µg, 1 µg y 10 µg). Un grupo sin células efectoras y tratamiento con vehículo sirvió de control adicional. La Tabla 13 resume la asignación de grupos y el programa de administración.

Tabla 13

Grupo	tratamiento	dosis	Concentración de células / animal	Cohorte	Programa (iv)	n
1	Vehículo	---	4x10 ⁶ HL-60			4
2	Vehículo	---	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
3	16	10 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
4	16	1 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
5	16	0,1 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
6	12	10 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
7	12	1 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3
8	12	0,1 µg	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 1	Día 0, 1, 2, 3, 4	3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 2		3
			4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ linfocitos T	Cohorte 3		3

Grupos de tratamiento para el estudio de dosis-respuesta *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de HL-60. Todos los animales en los grupos de control desarrollaron de forma fiable un tumor y presentaron crecimiento tumoral homogéneo. La presencia de linfocitos T no tuvo influencia sobre el desarrollo tumoral. No se observó diferencia en el crecimiento de HL-60 en presencia o ausencia de linfocitos T en los grupos tratados con control de vehículo.

5 El tratamiento con ambos artículos de prueba reveló un claro efecto antitumoral dependiente de la dosis (Figura 10). No se encontró diferencia sustancial entre los dos diacuerpos en tándem. La representación de volúmenes medios de tumor en la Figura 10 se restringió al día 29, cuando la mayoría de los grupos de tratamiento estuvieron completos. El estudio continuó hasta el día 45 y los animales se observaron para supervivencia sin tumores. En los grupos tratados con 10 o 1 µg de 16, 6 de los 9 animales no tuvieron tumor al final del periodo de observación y 5 de los 9 animales que recibieron 10 µg de 12 no tuvieron tumor en el día 45. Un animal siguió sin tumor cuando se trató con 1 µg de 12.

Todos los animales en los grupos de control desarrollaron de forma fiable un tumor y presentaron crecimiento tumoral homogéneo. El tratamiento con cualquiera de los diacuerpos en tándem reveló un efecto antitumoral dependiente de la dosis y no se encontró diferencia sustancial entre los dos diacuerpos en tándem hasta el día 29.

15 Se observaron diferencias detectables solo después de la observación prolongada (día 45), momento en el que los grupos de dosis baja y de control ya se habían sacrificado debido al crecimiento de tumores grandes. Los grupos tratados con 16 tuvieron más animales sin tumor.

EJEMPLO 11

Modelo de tumor establecido

20 Se desarrolló un modelo de xenoinjerto en ratones NOD/scid con tumores HL-60 preestablecidos que empleó 16 para demostrar la viabilidad.

En resumen, se irradiaron subletalmente (2 Gy) ratones NOD/scid hembra inmunodeficientes y se inocularon por vía subcutánea con 4×10^6 células HL-60. En el día 9, los animales recibieron una única inyección en bolo de anticuerpo de conejo anti-asialo GM1 (Wako, Neuss, Alemania) para reducir los linfocitos citolíticos naturales (NK) murinos. En el día 10, cuando el tumor alcanzó un volumen entre 50-150 mm³ (media 73 ± 11 mm³), los animales se asignaron a 3 grupos de tratamiento. Los grupos 2 y 3 (8 animales cada uno) se inyectaron por vía intraperitoneal con $1,5 \times 10^7$ linfocitos T humanos activados. Antes de la inyección, los linfocitos T se aislaron de capas leucocíticas (donantes sanos) empleando selección negativa. Se expandieron los linfocitos T y se activaron con el kit T-Cell Activation / Expansion Kit según la especificación del fabricante (Miltenyi Biotech). Para tratar la posible variabilidad de donantes, los grupos 2 y 3 se subdividieron en dos cohortes, cada una de las cuales recibió linfocitos T expandidos y activados de un donante individual. Cada cohorte recibió linfocitos T de un solo donante individual de linfocitos T.

Tabla 14: Grupos de tratamiento para el modelo de xenoinjerto de HL-60 establecido.

Grupo	Animales (n)	Células inoculadas		Cohorte	Tratamiento
		Día 0, sc.	Día 10, ip.		
1	5	4×10^6 HL-60			Vehículo (iv)
2	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ linfocitos T (Donante 1)	1	Vehículo (iv)
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ linfocitos T (Donante 2)	2	
3	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ linfocitos T (Donante 1)	1	TandAb 16 (iv) 50 µg
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ linfocitos T (Donante 2)	2	

35 A partir del día 13, los animales en el grupo 3 presentaron un volumen medio del tumor de 105 mm³ y se trataron con un total de 9 dosis intravenosas de 50 µg de diacuerpo en tándem 16 (qdx9d). La Tabla 14 ilustra la asignación de grupos y el programa de administración. Los grupos 1 y 2 solo se trataron con el vehículo. Se determinó el peso corporal y el volumen del tumor hasta el día 27.

40 Todos los animales desarrollaron de forma fiable un tumor, que fue palpable en el día 6. Aumentó continuamente el volumen medio de los animales del grupo 1 y 2 tratados con vehículo (HL-60) hasta la finalización del estudio en el día 27 (Figura 11). En los animales del grupo 2 que recibieron linfocitos T humanos activados primarios, además de células tumorales HL-60, el volumen medio del tumor aumentó más rápido en comparación con el grupo 1 (HL-60 solo).

El tratamiento intravenoso repetido desde los días 13 a 21 (qdx9d) con diacuerpo en tándem 16 (50 µg/animal; 2,5 mg/kg) en presencia de linfocitos T humanos (grupo 3) retrasó rápidamente el crecimiento tumoral con respecto al

grupo 1 y el grupo 2. El diacuerpo en tándem 16 retrasó el crecimiento tumoral en el grupo 3 aproximadamente 4 - 5 días en comparación con el grupo tratado con control de vehículo (grupo 2). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas en el periodo de tiempo desde el día 6 hasta el día 27 entre el grupo 2 (HL-60, linfocitos T, vehículo) y grupo 3 (HL-60, linfocitos T, 16) en el día 22 ($p < 0,05$), día 23 ($p < 0,01$) y día 27 ($p < 0,01$) (ANOVA bilateral de medidas repetidas con pruebas a posteriori de Bonferroni). No estuvieron presentes diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 y el grupo 3 debido a un crecimiento lento poco usual del tumor en el grupo 1.

No se observó variabilidad entre donantes con respecto a la actividad de linfocitos T, cuando se comparó el desarrollo tumoral en la cohorte 1 y la cohorte 2 dentro de un grupo, que recibió los linfocitos T de diferentes donantes (véase la Tabla 14).

El Ejemplo 10 muestra que se desarrolló satisfactoriamente un modelo de xenoinjerto en ratones NOD/scid con un tumor HL-60 preestablecido (LMA) y linfocitos T humanos injertados por vía intraperitoneal. La administración repetida con diacuerpo en tándem 16 a un nivel de dosis única conduce a un retraso estadísticamente significativo en el crecimiento tumoral en comparación con el grupo tratado con control de vehículo respectivo. Los datos generados son comparables a los resultados publicados para un estudio similar con BITE™ de CD33/CD3 (Aigner et al., 2012; Leukemia, 2013, Apr;27(5):1107-15).

EJEMPLO 12

Eficacia de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 en un modelo de XDP de LMA en ratones NSG

Se usaron células criopreservadas de un paciente con LMA cuya leucemia CD33⁺ contuvo 2-4 % de linfocitos T CD3⁺ para establecer un modelo de XDP de LMA en ratones NSG. Una hora después de la inyección de células tumorales en ratones NSG irradiados (250 cGy), los diacuerpos en tándem de CD33/CD3, 16 o 12, se inyectaron a cualquiera de dos dosis i.v. (50 µg o 5 µg; n= 8 ratones/grupo) en un bolo de 200 µL. Se realizaron inyecciones adicionales de los diacuerpos en tándem en cada uno de los 4 días siguientes. Los ratones se pesaron una vez a la semana, y posteriormente se sacrificaron en el día 38 para permitir la recogida de sangre periférica, médula ósea y bazo para el análisis por citometría de flujo (CD33hu, CD34hu, CD45hu, CD45mu, CD14hu, CD3hu, CD4hu, CD8hu y 7AAD). Los resultados se muestran en la Figura 12.

La Figura 12 muestra que los ratones sin tratar tuvieron cantidades sustanciales de blastos humanos en la médula ósea y el bazo después de 38 días. A diferencia, los ratones tratados con inyecciones i.v. diarias de los diacuerpos en tándem 12 o 16 presentaron números sustancialmente más bajos de blastos de LMA humana en la médula ósea y en el bazo. Se observó el fuerte efecto anti-LMA del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 a ambos niveles de dosis (5 y 50 µg/inyección).

El efecto anti-LMA observado para ambos diacuerpos en tándem de CD33/CD3, 12 y 16, fue mucho más fuerte que el efecto de un anticuerpo de CD123/CD3 DART® que se dirige a LMA en un modelo de ratón idéntico (Hussaini et al.: "Targeting CD123 In Leukemic Stem Cells Using Dual Affinity Re-Targeting Molecules (DARTs®)", 15 de noviembre de 2013; Blood: 122 (21)). A diferencia de los diacuerpos en tándem de CD33/CD3 que eliminaron casi todos los blastos de LMA en médula ósea y bazo, Hussaini et al. informaron que DART® de CD123/CD3 redujo el número de blastos de LMA en la médula ósea y el bazo en el modelo de XDP solo en un factor de 50-1000 a 2,5 y 0,25 mg/kg, los autores informaron además que el DART™ de CD123/CD3 redujo el número de blastos de LMA en médula ósea y bazo en el modelo de XDP solo en 40-78 % a 0,5 mg/kg.

EJEMPLO 13

Aparición rápida de lisis de células diana mediada por diacuerpos en tándem de CD33/CD3 16

Para evaluar la cinética de la lisis de células diana mediada por diacuerpos en tándem de CD33/CD3, se realizaron ensayos de citotoxicidad por liberación de calceína con diferentes tiempos de incubación. Se incubaron las células diana HL-60 CD33⁺ marcadas con calceína con diluciones sucesivas del diacuerpo en tándem 16 en presencia de linfocitos T humanos primarios como células efectoras en una relación E:D de 25:1 durante 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o 5 h. En cada momento de tiempo, la calceína que se liberó de las células diana lisadas se usó para calcular el valor de CE₅₀ y la lisis de células diana mediada por el diacuerpo en tándem 16 usando regresión no lineal/dosis-respuesta sigmoide. La **Figura 13** muestra una inesperada aparición rápida de la lisis de células diana mediada por diacuerpos en tándem con más de 40 % lisis después de 30 min de incubación a concentraciones de saturación de diacuerpos en tándem. Después de 4 horas de incubación, se alcanzó más del 90 % de lisis de células diana. La **Tabla 15** y **Figura 14** resumen las CE₅₀ y los valores de lisis específica determinados para el diacuerpo en tándem 16 en los tiempos de incubación entre 30 min y 5 horas. Los resultados demuestran además que en las condiciones de ensayo usadas se alcanzó la máxima potencia (valor de CE₅₀ más bajo) después de 2 horas de incubación y que después de 5 horas de incubación se lisaron casi todas las células diana. En conjunto, estos resultados demuestran una lisis de células diana muy rápida, potente y eficaz mediada por los diacuerpos en tándem de CD33/CD3.

TABLA 15: Cinética de CE₅₀ y valores de lisis determinados para el diacuerpo en tándem 16

Tiempo de incubación [min]	CE ₅₀ [pM]	Lisis mediada por diacuerpos en tándem [%]
30	4,8	44,1
60	2,5	59,8
120	1,6	75,1
180	1,6	88,8
240	1,5	93,7
300	1,6	97,4

EJEMPLO 145 Protocolo del ensayo clínico de viabilidad para la administración de diacuerpos en tándem de CD33/CD3 a pacientes con LMA

Ensayo clínico de fase I/II para estudiar el diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16 como un tratamiento para leucemia mieloide aguda (LMA).

Resultados del estudio:

Primarios: Dosis máxima tolerada de diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16

10 *Secundarios:* Determinar si la respuesta *in vitro* del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16 está asociada con la respuesta clínica

Fase I

La dosis máxima tolerada (DMT) se determinará en la sección de fase I del ensayo.

1.1 La dosis máxima tolerada (DMT) se determinará en la sección de fase I del ensayo.

15 1.2 Participarán en el ensayo del diacuerpo en tándem CD33/CD3 16 los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad.

20 1.3 El objetivo es identificar la dosis más alta del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16 que se puede administrar de forma segura sin efectos secundarios intensos o incontrolables en los participantes. La dosis administrada dependerá del número de participantes que se hayan reclutado en el estudio antes y cómo de bien se toleró la dosis. No todos los participantes recibirán la misma dosis.

Fase II

2.1 Una sección de fase II posterior se tratará con la DMT con el objetivo de determinar si la terapia con la terapia del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16 da como resultado al menos un 20 % de tasa de respuesta.

25 Resultado primario para la fase II --- Determinar si la terapia del diacuerpo en tándem de CD33/CD3 16 da como resultado al menos 20 % de pacientes que logran una respuesta clínica (respuesta de blastos, respuesta leve, respuesta parcial o respuesta completa).

Elegibilidad:

LMA documentada por análisis de sangre periférica y médula ósea que cumple los criterios de la OMS, excluyendo pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA)

30 Pacientes con LMA resistente a quimioterapia de inducción primaria, enfermedad recidivante o edad ≥ 60 y no apropiados para terapia citotóxica habitual debido a la edad, estado de rendimiento y/o factores de riesgo adversos según el médico práctico

Edad ≥ 18 años

Estado de rendimiento de Karnofsky ≥ 50 % o estado de rendimiento de ECOG 0-2

35 Esperanza de vida ≥ 6 semanas

Aunque se han mostrado ciertas realizaciones y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo. Ahora se producirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones por los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Se debe entender que las diversas alternativas a las realizaciones descritas en el presente documento se pueden emplear en la práctica de las realizaciones. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que así se cubran los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ELLWANGER, KRISTINA
- EVNIN, LUKE
- 10 FOX, JUDITH A.
- FUCEK, IVICA
- GUENOT, JEANMARIE
- KNACKMUSS, STEFAN
- KUNKEL, LORI
- 15 LITTLE, MELVYN
- MOLKENTHIN, VERA
- RAJKOVIC, ERICH
- REUSCH, UWE
- WALL, CLAUDIA
- 20 WEICHEL, MICHAEL
- ZHUKOVSKY, EUGENE

- <120> PROTEÍNAS DE UNIÓN A CD33 Y CD3 BIESPECÍFICAS

- 25 <130> 45375-704.601

- <140> 14/642.497
- <141> 09-03-2015

- 30 <150> 62/111.470
- <151> 03-02-2015

- <150> 62/019.795
- <151> 01-07-2014
- 35
- <160> 122

- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 863 600 T3

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 1

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

Thr Ala Met Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Thr Thr Val
20 25 30

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

Asp Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

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

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

10

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 2

ES 2 863 600 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 110

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 4

ES 2 863 600 T3

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

10 <211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

15

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

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

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

Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

ES 2 863 600 T3

50 55 60

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

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

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

<210> 6

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

10 Asn Gly Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 863 600 T3

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

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

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

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

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

10

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 9

ES 2 863 600 T3

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 9

```

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1           5           10           15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20           25           30

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

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

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

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

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

```

10 <210> 10

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 10

ES 2 863 600 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 11

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 863 600 T3

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

<210> 12

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

10

ES 2 863 600 T3

Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Phe Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

<210> 13

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Ala Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

10

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 863 600 T3

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Phe Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

<210> 15

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

10

ES 2 863 600 T3

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

<210> 16

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 863 600 T3

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

<210> 17

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

10

ES 2 863 600 T3

Ala Arg His Lys Arg Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

10

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 863 600 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

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

<210> 20

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

10

ES 2 863 600 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

<210> 21

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

10 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Thr Thr Val His
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 22

20 Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 23

ES 2 863 600 T3

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 23

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 24

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

15

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 25

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

25 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ile Val Asn
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
1 5 10

35

ES 2 863 600 T3

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 27

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Val Val Asn
1 5 10

10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 28

Asp Asp Asn Glu Arg Pro Ser
1 5

20

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 29

Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

30

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 30

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

ES 2 863 600 T3

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 31

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 32

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

20

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 33

Ser Asn Asn Gln Arg Ser Ser
1 5

30

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

35

Ser Thr Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

ES 2 863 600 T3

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 35

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
1 5

10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 36

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly
1 5

20

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 37

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
1 5

30

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 38

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Asp
1 5
53

ES 2 863 600 T3

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 39

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly
1 5

10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 40

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
1 5

20

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

25

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala
1 5

<210> 42

<211> 6

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

35

Ser Asn Tyr Gly Ile His
1 5

ES 2 863 600 T3

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 43

Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

10

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 44

Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5

20

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

30

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 46

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

ES 2 863 600 T3

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 47

Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

10

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 48

Asp Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

20

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

25

Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

ES 2 863 600 T3

Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 51

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

10

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

Gln Gly

<210> 52

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

20

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 53

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

30

Gly

ES 2 863 600 T3

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

10

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 55

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala His Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

20

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 56

Asp Arg Leu Glu Ser Ala Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57

30

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 863 600 T3

<400> 57

Asp Arg Ala Asn Thr Asp Phe Ser Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 58

Asp Arg Ala Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

15

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 59

Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

25

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 60

Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Gly Met Asp Val
1 5 10

35

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

ES 2 863 600 T3

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 62

His Lys Arg Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

15

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 63

Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

25

<210> 64

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 64

ES 2 863 600 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 65

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

ES 2 863 600 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 66

<211> 125

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

ES 2 863 600 T3

115

120

125

<210> 67

<211> 125

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

10

<210> 68

<211> 110

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 68

ES 2 863 600 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 69

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 70

ES 2 863 600 T3

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 70

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 71

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 71

ES 2 863 600 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

10 Ser Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 73

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 73

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

Val Lys Asp

20 <210> 74

ES 2 863 600 T3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 74

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 75

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

15

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 76

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

25

Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 77

35

Asn Thr Tyr Ala Met His
1 5

ES 2 863 600 T3

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 78

Asn Lys Tyr Ala Met Asn
1 5

10

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 79

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

Val Lys Asp

20

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

25

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

Val Lys Asp

30

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 863 600 T3

<400> 81

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

5 <210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 82

Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 83

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

20

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

Val Lys Gly

<210> 84

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

30

ES 2 863 600 T3

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

Val Lys Ser

<210> 85

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

10 His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 86

20 His Gly Asn Phe Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 87

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 87

30 His Gly Asn Phe Gly Cys Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 863 600 T3

<400> 88

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 89

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Phe Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 90

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

20

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 91

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

30

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

ES 2 863 600 T3

<400> 92

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu
1 5

5 <210> 93

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 93

Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu
1 5 10 15

Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr
20 25 30

Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala
35 40 45

Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu
50 55 60

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

ES 2 863 600 T3

Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn
 85 90 95

Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr
 100 105 110

Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro
 115 120 125

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu
 130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe
 145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His
 165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn
 180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg
 195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly
 210 215 220

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val
 225 230 235 240

Val His

<210> 94

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

10 Asp Gln Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln
 1 5

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 863 600 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 95

5

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 96

<211> 4

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 96

15

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 97

<211> 5

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 97

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 98

30

<211> 494

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

35

ES 2 863 600 T3

<400> 98

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

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

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 99

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

ES 2 863 600 T3

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
290 295 300

ES 2 863 600 T3

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 100

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 100

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

ES 2 863 600 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
 165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Phe Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

ES 2 863 600 T3

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 101

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 101

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 102

<211> 495

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 863 600 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 102

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
          20           25           30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
          50           55           60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
          100          105          110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
          115          120          125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
          130          135          140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145          150          155          160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
          165          170          175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
          180          185          190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
          195          200          205

```

5

ES 2 863 600 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Phe Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
 245 250 255

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile
 260 265 270

Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
 275 280 285

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
 290 295 300

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp
 325 330 335

Asp Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 340 345 350

Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 355 360 365

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 370 375 380

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 385 390 395 400

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
 405 410 415

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
 420 425 430

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 435 440 445

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly
 450 455 460

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 465 470 475 480

Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490 495

ES 2 863 600 T3

<211> 495

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 103

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
                20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
          100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
          115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
          130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
          165 170 175

```

ES 2 863 600 T3

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
 245 250 255

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile
 260 265 270

Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
 275 280 285

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
 290 295 300

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp
 325 330 335

Asp Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 340 345 350

Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 355 360 365

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 370 375 380

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 385 390 395 400

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
 405 410 415

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
 420 425 430

ES 2 863 600 T3

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 435 440 445

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly
 450 455 460

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 465 470 475 480

Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490 495

<210> 104

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 104

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
 115 120 125

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
 130 135 140

ES 2 863 600 T3

Phe Ser Asn Tyr Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Phe Tyr
 165 170 175
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 180 185 190
 Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 195 200 205
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Leu Glu Ser Ala Ala Phe Asp Tyr
 210 215 220
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 245 250 255
 Gln Thr Ala Met Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Thr Thr
 260 265 270
 Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val
 275 280 285
 Tyr Asp Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 290 295 300
 Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala
 305 310 315 320
 Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp
 325 330 335
 His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser
 340 345 350
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 355 360 365
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 370 375 380
 Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 385 390 395 400

ES 2 863 600 T3

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 405 410 415

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 420 425 430

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 435 440 445

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 450 455 460

Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 465 470 475 480

Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 105

<211> 496

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 105

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 863 600 T3

Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 130 135 140

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 180 185 190

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 210 215 220

Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 245 250 255

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser
 260 265 270

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln
 275 280 285

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 290 295 300

Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 305 310 315 320

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 325 330 335

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr
 340 345 350

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
 355 360 365

ES 2 863 600 T3

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
 370 375 380

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val
 385 390 395 400

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro
 405 410 415

Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
 420 425 430

Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 435 440 445

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala
 450 455 460

Asn Thr Asp Phe Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 465 470 475 480

Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490 495

<210> 106

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 106

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

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

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 107

<211> 494

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

ES 2 863 600 T3

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Phe Gly
210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
290 295 300

ES 2 863 600 T3

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 108

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 108

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

ES 2 863 600 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
 165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

ES 2 863 600 T3

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 109

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 109

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 110

5 <211> 483

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 863 600 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 110

5

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
                20                               25                               30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50                               55                               60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100                              105                              110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115                              120                              125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
130                              135                              140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145                              150                              155                              160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
165                              170                              175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
180                              185                              190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
195                              200                              205

```

ES 2 863 600 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255
 Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270
 Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285
 Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300
 Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335
 Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380
 Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430
 Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460
 Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480
 Val Ser Ser

ES 2 863 600 T3

<210> 111

<211> 494

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 111

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
165 170 175

10

ES 2 863 600 T3

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Phe Ser Tyr Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg

ES 2 863 600 T3

				420						425						430
Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	
		435					440					445				
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	
	450					455					460					
Ser	Tyr	Val	Ser	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
465					470					475					480	
Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	His								
				485					490							

<210> 112

<211> 494

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 112

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

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

385 390 395 400
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
450 455 460

Ser Tyr Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 113

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

ES 2 863 600 T3

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Phe
 165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Gly
 210 215 220

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly
 260 265 270

Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp
 325 330 335

Ser Leu Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

ES 2 863 600 T3

	355		360		365														
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly				
	370					375					380								
Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly				
	385				390					395					400				
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr				
				405					410					415					
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg				
			420					425					430						
Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr				
		435					440						445						
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn				
	450					455					460								
Ser	Tyr	Val	Ser	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
	465				470					475					480				
Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	His											
				485				490											

<210> 114

<211> 492

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 114

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

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

325 330 335

Ser Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
340 345 350

Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
355 360 365

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
370 375 380

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
385 390 395 400

Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
405 410 415

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
420 425 430

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
435 440 445

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
450 455 460

Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
465 470 475 480

Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 115

<211> 492

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

ES 2 863 600 T3

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala
130 135 140

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile
145 150 155 160

Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
165 170 175

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
195 200 205

Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
210 215 220

Asp Ser Ser Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Gly Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
245 250 255

Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly
260 265 270

Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly
275 280 285

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr

ES 2 863 600 T3

290 295 300

Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys
305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp
325 330 335

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Lys Arg Gly Ser Asp Ala Phe
340 345 350

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser
355 360 365

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
370 375 380

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala
385 390 395 400

Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys
405 410 415

Ala Pro Lys Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val
420 425 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Thr Leu Thr
435 440 445

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu
450 455 460

Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
465 470 475 480

Lys Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 116

<211> 495

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 116

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

ES 2 863 600 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
 20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr
 165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 180 185 190

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Val Pro Ala Ala Ile Asp Tyr Tyr
 210 215 220

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
 245 250 255

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

ES 2 863 600 T3

	260		265		270													
Gly	Ser	Asn	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro			
		275					280					285						
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp			
	290					295					300							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser			
305					310					315					320			
Gly	Leu	Gln	Ser	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp			
				325					330					335				
Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val			
			340					345					350					
Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly			
		355					360					365						
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser			
	370					375					380							
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro			
385					390					395					400			
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn			
				405					410					415				
Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser			
			420					425					430					
Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys			
		435					440					445						
Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly			
	450					455					460							
Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val			
465					470					475					480			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	His									
				485					490						495			

<210> 117

<211> 484

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 863 600 T3

<400> 117

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

ES 2 863 600 T3

225 230 235 240

Gly Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
 245 250 255

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
 260 265 270

Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
 275 280 285

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
 290 295 300

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
 305 310 315 320

Gly Leu Gln Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp
 325 330 335

Asp Ser Leu Asn Gly Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 340 345 350

Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 355 360 365

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 370 375 380

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 385 390 395 400

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
 405 410 415

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
 420 425 430

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 435 440 445

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly
 450 455 460

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 465 470 475 480

Thr Val Ser Ser

<210> 118

5 <211> 494

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 863 600 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 118

5

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
                20                               25                               30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50                               55                               60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
                100                               105                               110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
                115                               120                               125

Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr
130                               135                               140

Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145                               150                               155                               160

Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Tyr Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr
                165                               170                               175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
                180                               185                               190

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

```

ES 2 863 600 T3

195					200					205					
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Trp	Ala
210						215					220				
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
225					230					235					240
Ser	Gly	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro
				245					250					255	
Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly
			260					265					270		
Ser	Asn	Ile	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys
		275					280					285			
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
	290					295					300				
Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly
305					310					315					320
Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp
				325					330					335	
Ser	Leu	Lys	Gly	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
			340					345					350		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
		355					360					365			
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
	370					375					380				
Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
385					390					395					400
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr
				405					410					415	
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg
			420					425					430		
Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr
		435					440					445			
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn
	450					455					460				
Ser	Tyr	Val	Ser	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
465					470					475					480
Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	His							
			485						490						

ES 2 863 600 T3

<210> 119

<211> 494

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
145 150 155 160

10

Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala His Tyr

ES 2 863 600 T3

165 170 175

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
180 185 190

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Ala
210 215 220

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
245 250 255

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly
260 265 270

Ser Asn Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
275 280 285

Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg
290 295 300

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
305 310 315 320

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp
325 330 335

Ser Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
405 410 415

ES 2 863 600 T3

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
450 455 460

Ser Tyr Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 120

<211> 483

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 120

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
450 455 460

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 121

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 121

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
20 25 30

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

Ala Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly

ES 2 863 600 T3

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

ES 2 863 600 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 355 360 365

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 405 410 415

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 420 425 430

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 435 440 445

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 450 455 460

Ser Tyr Val Ser Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 485 490

<210> 122

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Marca 6xHis sintética

10 <400> 122

His His His His His His
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un diacuerpo en tándem de unión al antígeno biespecífico específico de CD33 humano y CD3 humano, en donde dicho diacuerpo en tándem comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, teniendo cada polipéptido al menos cuatro dominios de cadena variables unidos uno después del otro, en donde cada polipéptido comprende
- 5 (i) un dominio de cadena pesada variable (VH) específico de CD33 humano;
- (ii) un dominio de cadena ligera variable (VL) específico de CD33 humano;
- (iii) un dominio VH específico de CD3 humano, y
- (iv) un dominio VL específico de CD3 humano,
- 10 en donde cada polipéptido comprende una combinación de cuatro dominios de cadena variables seleccionados del grupo que consiste en
- (a) SEQ ID NO: 3, 13, 64 y 68;
- (b) SEQ ID NO: 2, 12, 64 y 68;
- (c) SEQ ID NO: 4, 14, 64 y 68;
- (d) SEQ ID NO: 5, 15, 64 y 68;
- 15 (e) SEQ ID NO: 6, 16, 64 y 68; o
- (f) SEQ ID NO: 9, 19, 64 y 68;
- y en donde en cada polipéptido, los cuatro dominios de cadena variables se unen uno después del otro por conectores peptídicos L1, L2 y L3 en el orden de:
- 20 VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3);
- VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3);
- VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD3 3); o
- VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).
2. El diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1, en donde los conectores L1, L2 y L3 consisten en aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos.
- 25 3. El diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1, en donde los conectores L1, L2 y L3 se seleccionan cada uno independientemente de GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97).
4. El diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1, en donde los conectores L1 y L3 son GGSGGS (SEQ ID NO: 95) y el conector L2 es GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97).
5. El diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1, en donde los cuatro dominios de cadena variables se unen uno después del otro por conectores peptídicos L1, L2 y L3 en el orden de
- 30 VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); y
- en donde los conectores L1 y L3 son GGSGGS (SEQ ID NO: 95) y el conector L2 es GGSG (SEQ ID NO: 96) o GGSGG (SEQ ID NO: 97).
6. El diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1, en donde el diacuerpo en tándem es el diacuerpo en tándem 12 (SEQ ID NO: 109), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 19 (SEQ ID NO: 116) o 22 (SEQ ID NO: 119).
7. El diacuerpo en tándem de unión al antígeno biespecífico según la reivindicación 1, en donde el diacuerpo en tándem posee KD de unión de 10 nM o menos por CD33 en células tumorales CD33⁺ seleccionadas de HL-60, KG-1 y U-937.
8. El diacuerpo en tándem de unión al antígeno biespecífico según la reivindicación 1, en donde el diacuerpo en tándem se une específicamente a un epítipo de CD33 humano que está dentro de ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (restos de aminoácidos 62-70 de SEQ ID NO: 93) de CD33 humano.
9. Una composición para su uso en el tratamiento de un cáncer CD33⁺ en un individuo que padece cáncer CD33⁺, comprendiendo la composición un diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1.

- 5 10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en donde el cáncer CD33⁺ es leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica de precursores de linfocitos B, sarcoma mielóide, mieloma múltiple, linfoma agudo, linfoma linfoblástico agudo o leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), opcionalmente en donde el cáncer CD33⁺ es LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, neoplasias mieloides relacionadas con la terapia, sarcoma mielóide, proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down o neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas.
11. La composición para el uso de la reivindicación 9, en donde la LMA se ha diagnosticado recientemente, es recidivante o resistente al tratamiento.
- 10 12. La composición para el uso de la reivindicación 9, en donde la composición comprende además citarabina, azacitidina, decitabina, antraciclina, fludarabina, clofarabina, cladribina, nelarabina, metotrexato, bortezomib, carfilzomib, melfalán, ibrutinib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, apremilast, una epipodofilotoxina, una antracenediona, un agente anti-CD20 o combinaciones de los mismos.
13. Una composición para su uso en el tratamiento de síndrome displásico mielóide (SDM) en un individuo que padece SDM, comprendiendo la composición un diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1.
- 15 14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en donde la composición comprende además citarabina, azacitidina, decitabina, una antraciclina, amsacrina, fludarabina, clofarabina, cladribina, nelarabina, metotrexato, bortezomib, carfilzomib, melfalán, ibrutinib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, apremilast, una epipodofilotoxina, una antracenediona, un agente anti-CD20 o combinaciones de los mismos.
- 20 15. Una composición para su uso en el tratamiento de inmunosupresión por células supresoras derivadas de mielóide (CSDM) en un individuo que padece inmunosupresión, que comprende un diacuerpo en tándem biespecífico según la reivindicación 1.

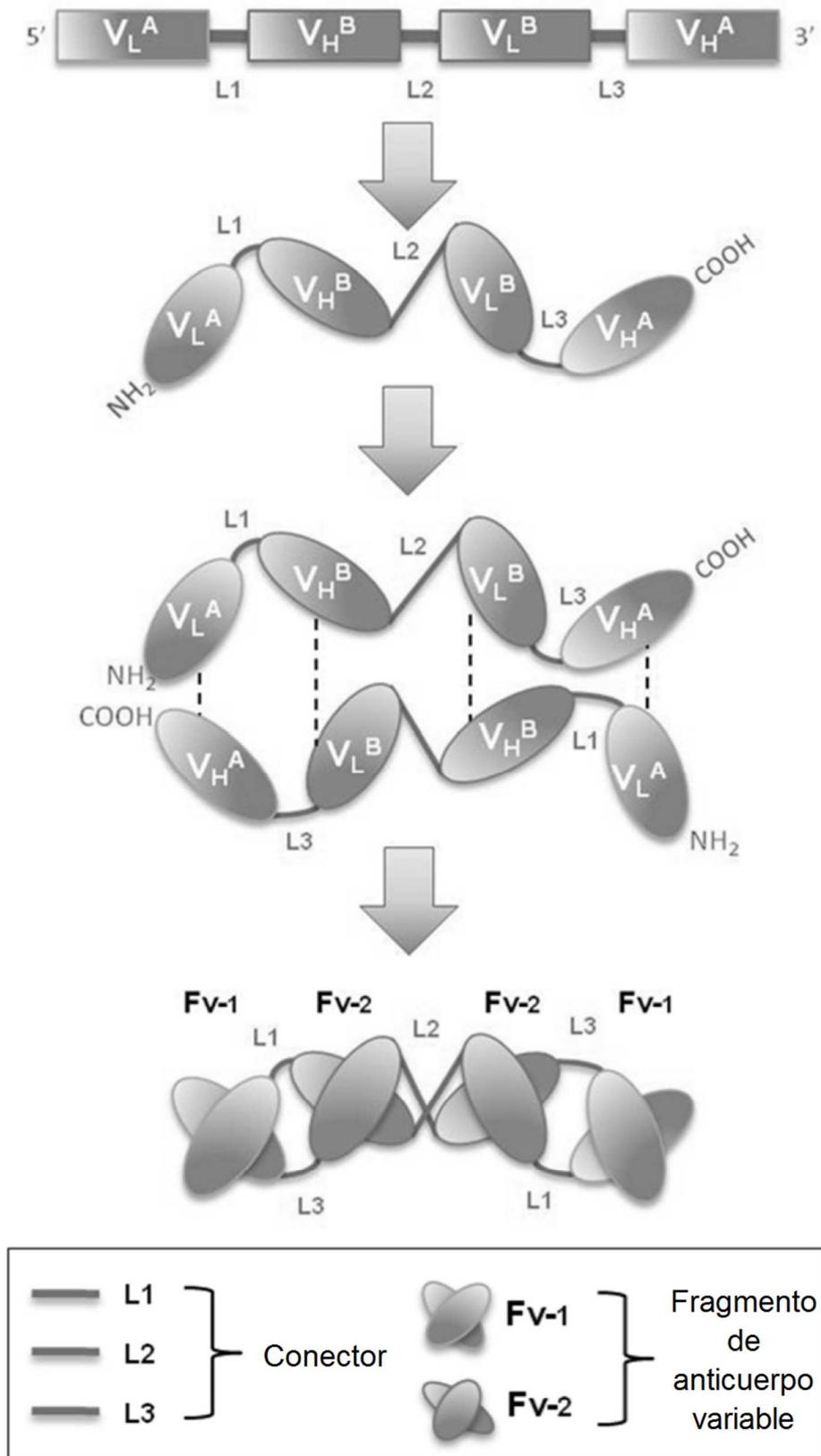


Figura 1

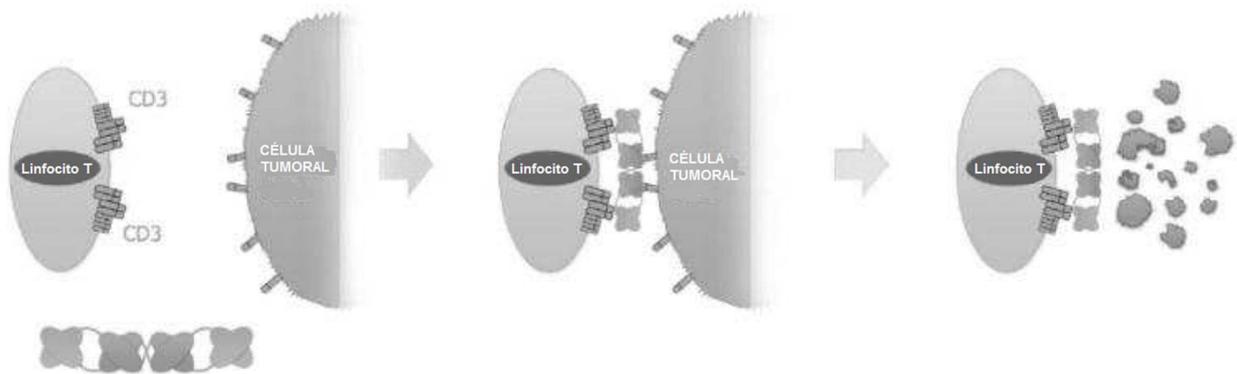


Figura 2



Figura 3

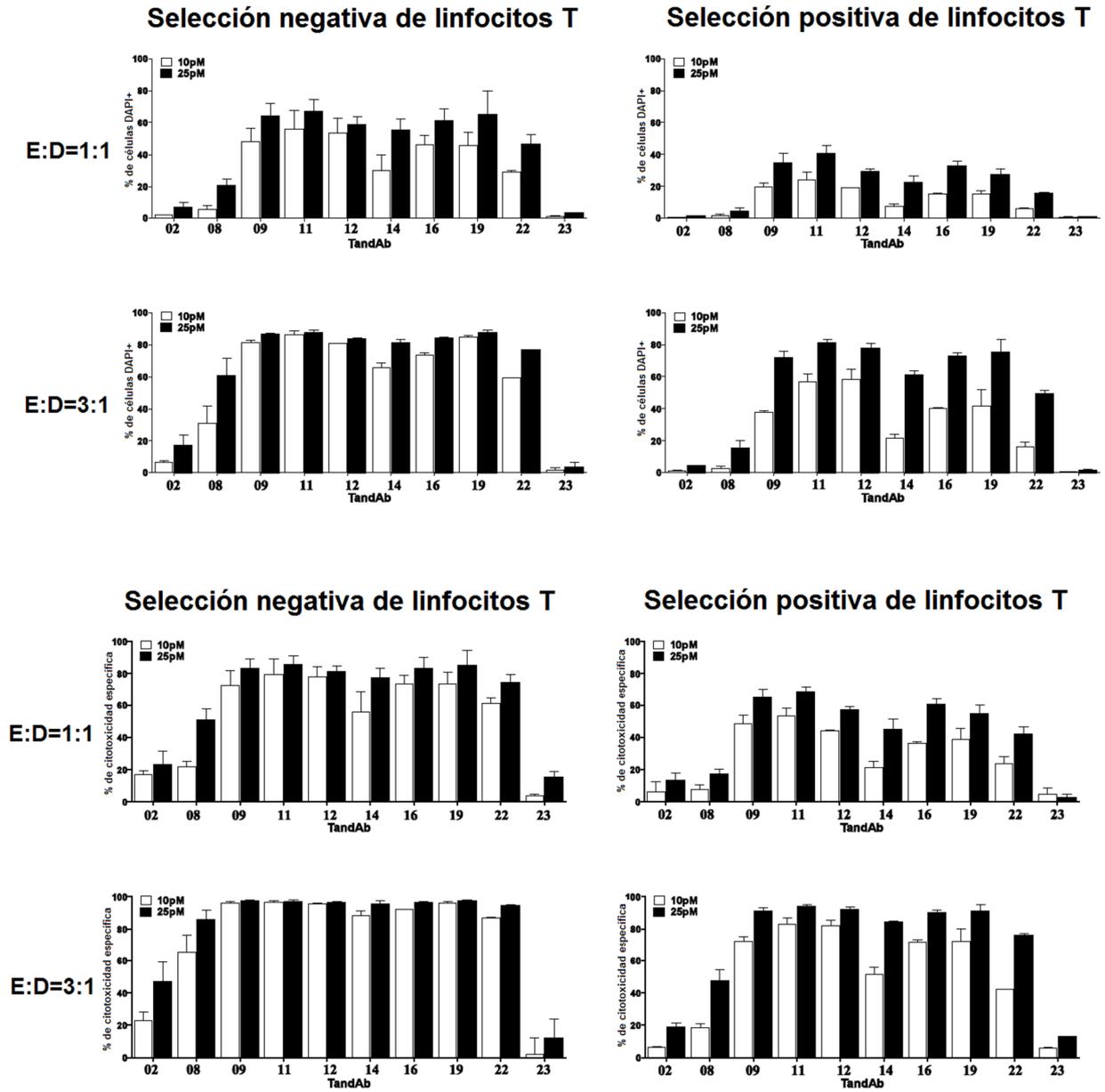


Figura 4

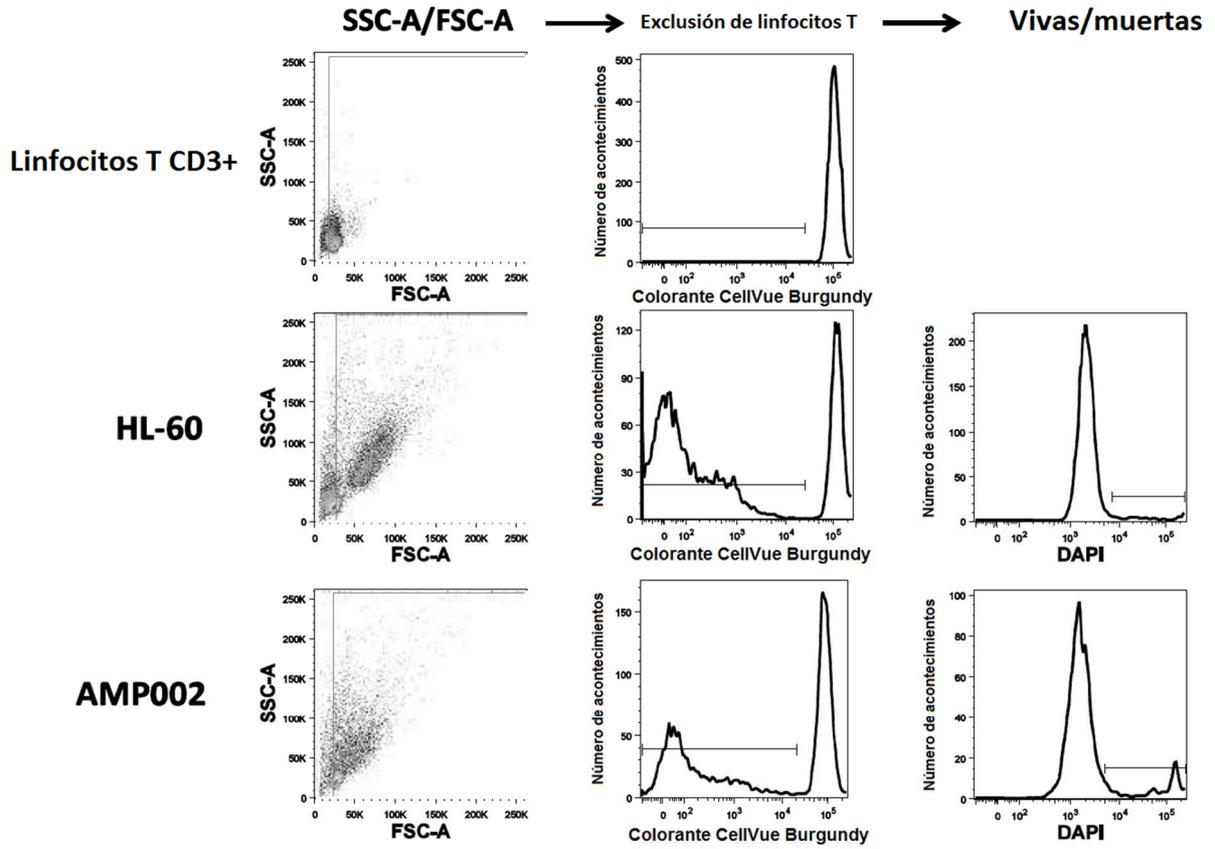


Figura 5

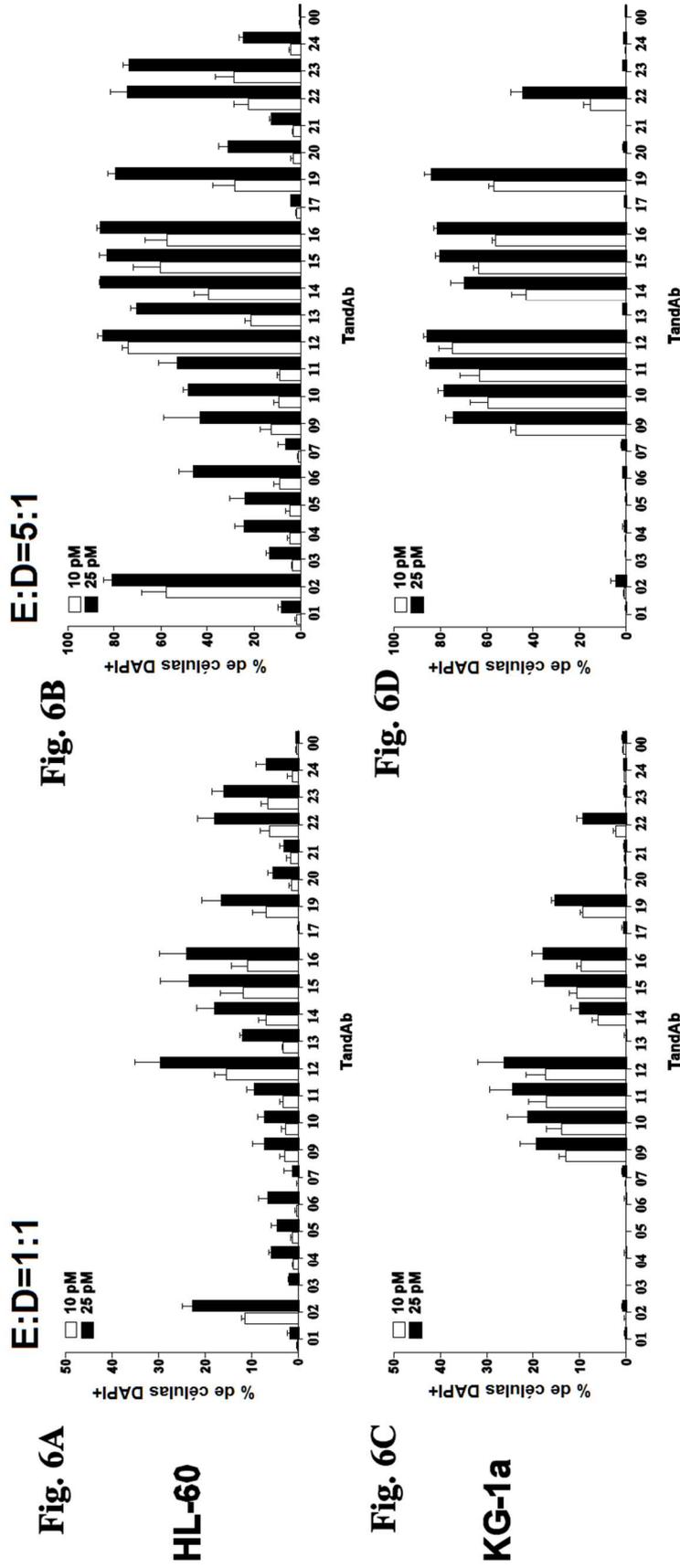


Figura 6

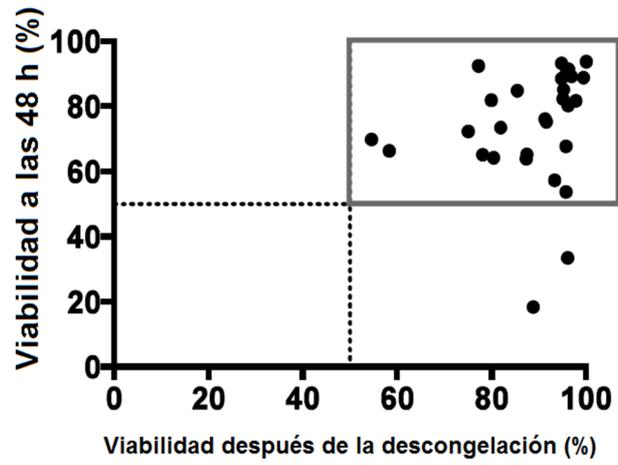


Figura 7

Fig. 8A

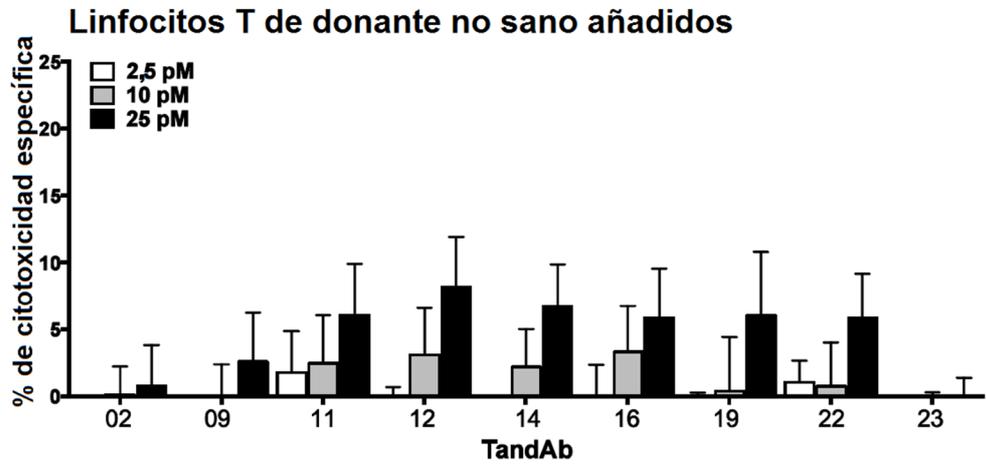


Fig. 8B

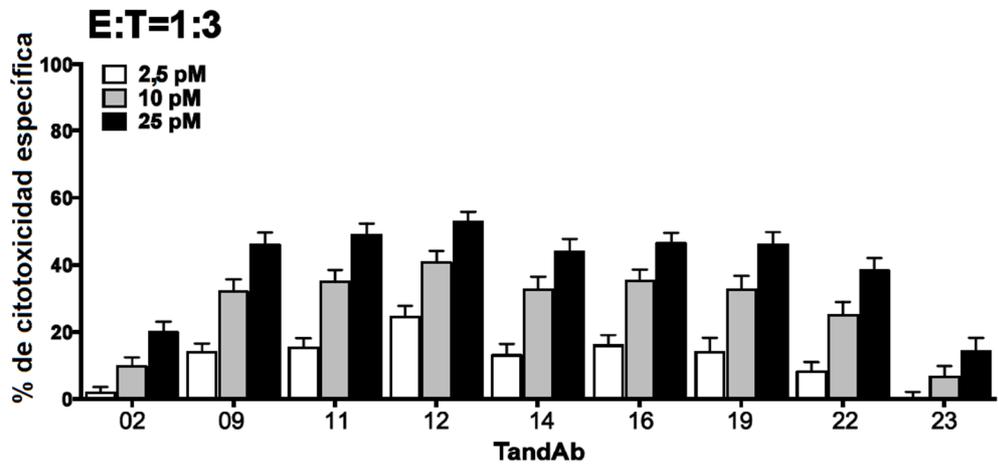


Fig. 8C

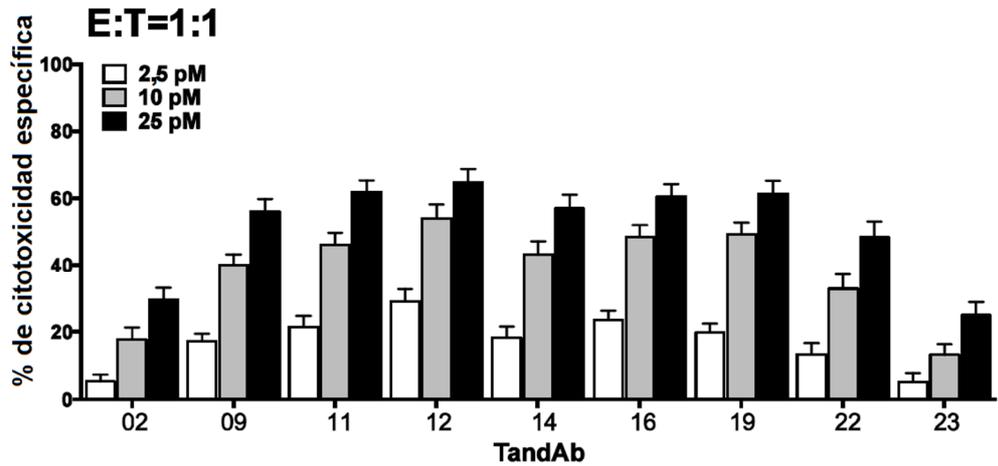


Figura 8

ES 2 863 600 T3

DPNFWLQVQE SVTVQEGLCV LVPCTFFHPI PYYDKNSPVH GYWFREGAII SRDSPVATNK 60
LDQEVQEEETQ GRFRLLDGDP RNNCSLSIVD ARRRDNGSYF FRMERGSTKY SYKSPQLSVH 120
VTDLTHRPKI LIPGTLEPGH SKNLTCVSW ACEQGTPIIF SWLSAAPTSL GPRTHSSVL 180
IITPRPQDHG TNLTCQVKFA GAGVTTERTI QLNVTYVPQN PTTGIFPGDG SGKQETRAGV 240
VH 242

SEQ ID NO:93

Figura 9A

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK**GGSGGS**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLVTVSS**GG**
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIQSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVL**GGSGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGDFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:98

Figura 9B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK**GGSGGS**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDYVYVYMDVWGQGLVTVSS**GG**
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIQSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVL**GGSGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGDFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:99

Figura 9C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK**GGSGGS**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSS**GG**
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIQSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVL**GGSGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGDFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:100

Figura 9D

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTQTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:101

Figura 9E

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTQTLV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:102

Figura 9F

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTQTLV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:103

Figura 9G

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLQESGGGVVQPGRSRLSRLSCAASGFSSNYGIHWVRQAPGKG
LEWVALISYDGNKKFYADSVKGRFAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAKDRLESAAFDYWGQGLTQTLVTVSSGGSGG
SSYELTQPPSVSVAPGQTAMITCGGNNIGSTTVHWYQKPGQAPVLVYDDNERPSGIPERFSGSNSGSTATLTINRVEA
GDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL
EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTQTLVTVSS
AAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:104

Figura 9H

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQ
SEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKG
LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTVTVS
GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDK
ATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWV
RQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLT
VTVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:105

Figura 9I

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLTVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:106

Figura 9J

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLTVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:107

Figura 9K

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGLTVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:108

Figura 9L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFRSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTQTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:109

Figura 9M

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFRSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTQTLV
VSS

SEQ ID NO:110

Figura 9N

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFRSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTQTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:111

Figura 9O

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLTQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFRSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTQTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:112

Figura 9P

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGMNPNNGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGLTVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNGFNSYVSYFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:113

Figura 9Q

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG
LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARHKGSDAFDIWGQGT TVTVSSGGSGQ
SVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ
AEDEADYYCQSYDSSLSDVVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKG
LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNGFNSYVSYFAYWGQGLTVTVS
SAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:114

Figura 9R

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNS
LYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNGFNSYVSYFAYWGQGLTVTVSSGGSGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG
AGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSDVVFGGKTLT
VLGGSGQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTTISADK
SISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHKGSDAFDIWGQGT TVTVSSGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGA
VTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEI
KAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:115

Figura 9S

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQG
LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDVPAIDYYGMDVWGQGT TVTVSSGG
GSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP
GKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNGFNSYVSYFAYWGQGLTV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:116

Figura 9T

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSTSYMHWVRQAPGQG
LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDVVPAAIDYGMVWVGQTTVTVSSG
GSGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQTLV
TVSS

SEQ ID NO:117

Figura 9U

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQG
LEWMGGIYPIFGSANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNIVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLKGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQTLVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:118

Figura 9V

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQTLVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:119

Figura 9W

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQTLVT
VSS

SEQ ID NO:120

Figura 9X

ES 2 863 600 T3

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFDSYAIWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYSQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNVNWYQLPGTAPKLLIYSTNKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSL SAYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDVAVYYCARHGNGFNSYVSYFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH
SEQ ID NO:121

Figura 9Y

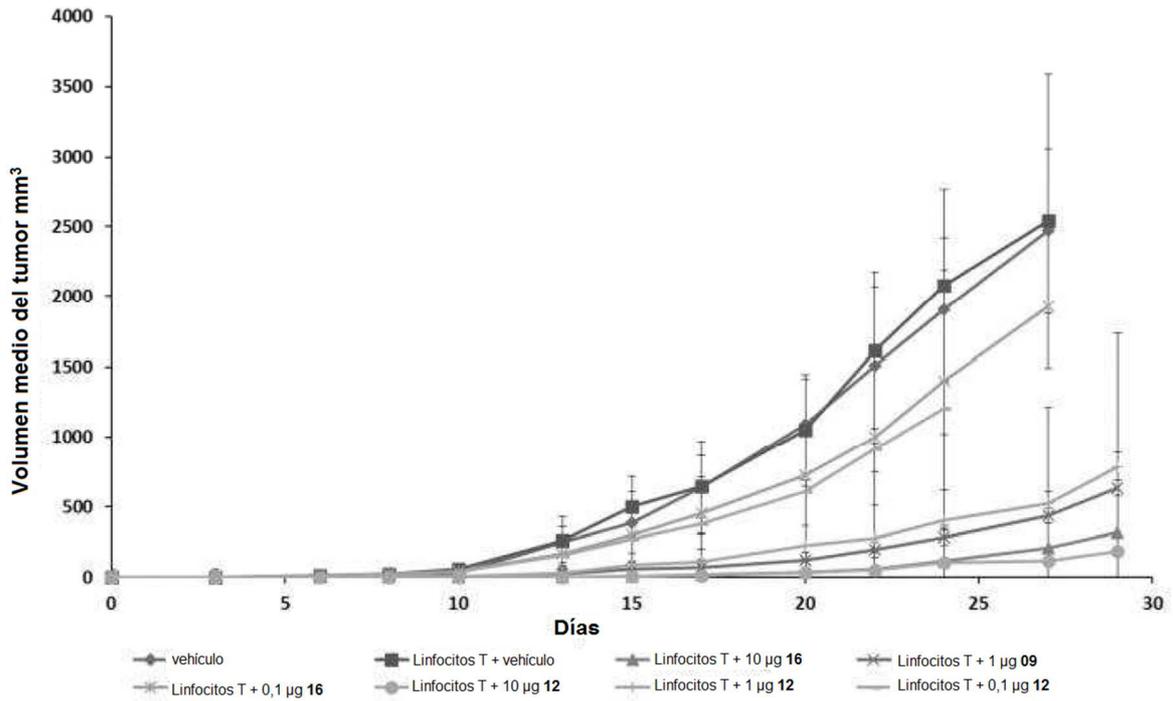


Figura 10

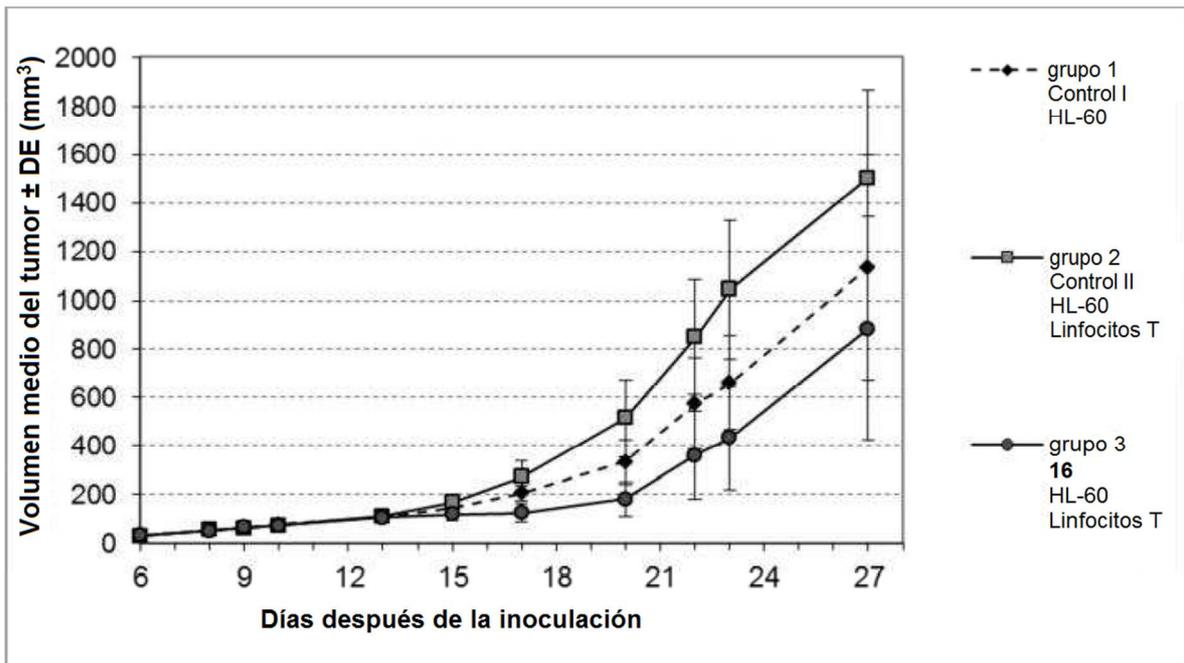


Figura 11

Figura 12A

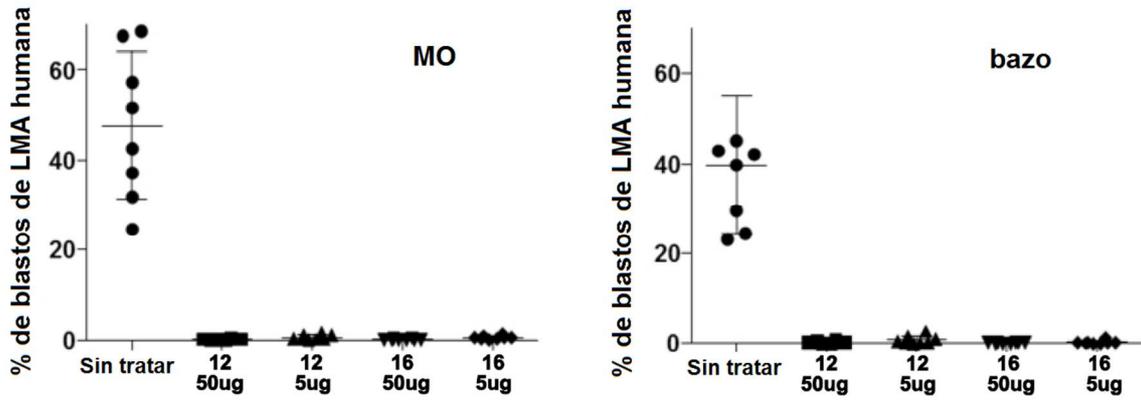


Figura 12B

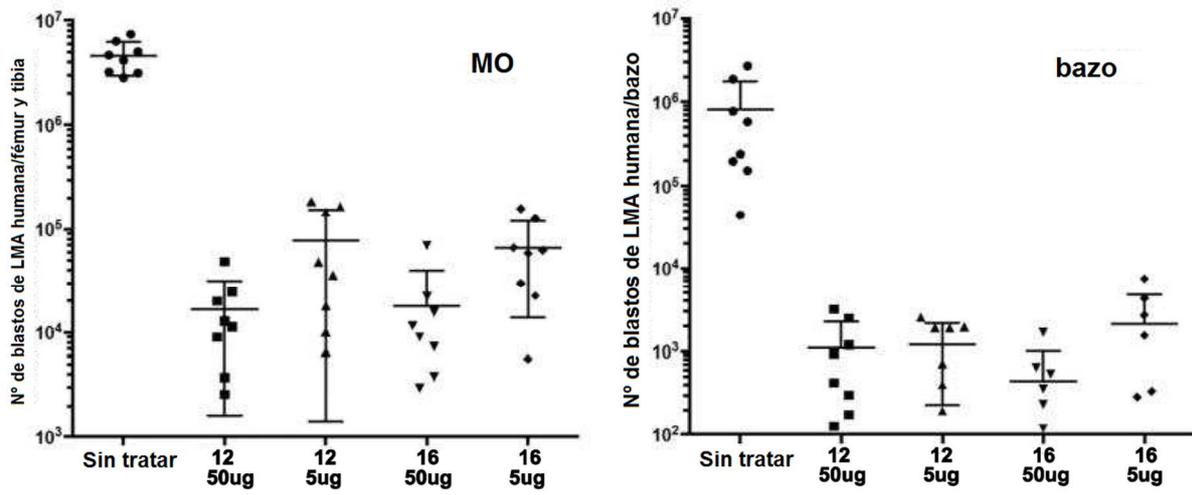


Figura 12

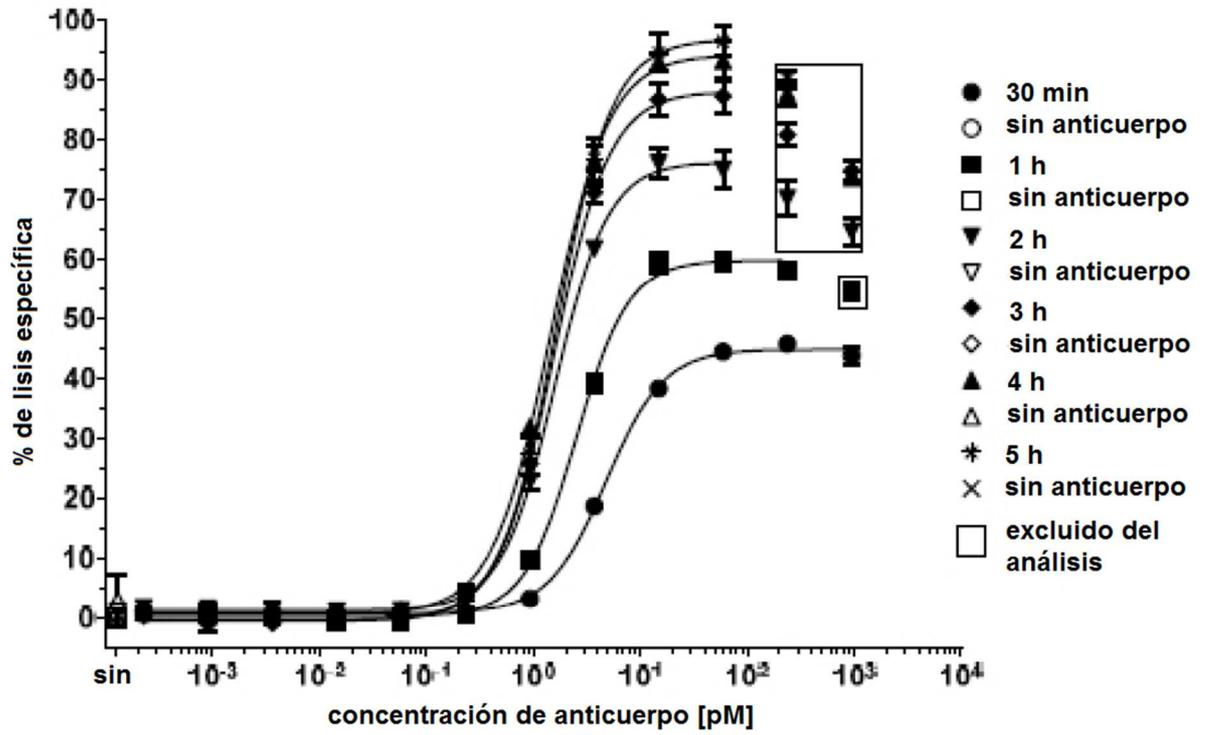


Figura 13

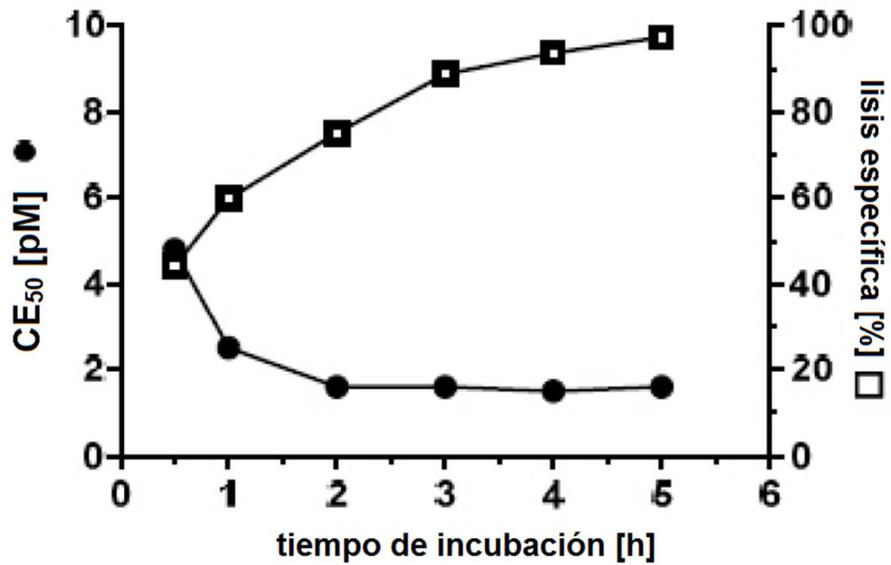


Figura 14

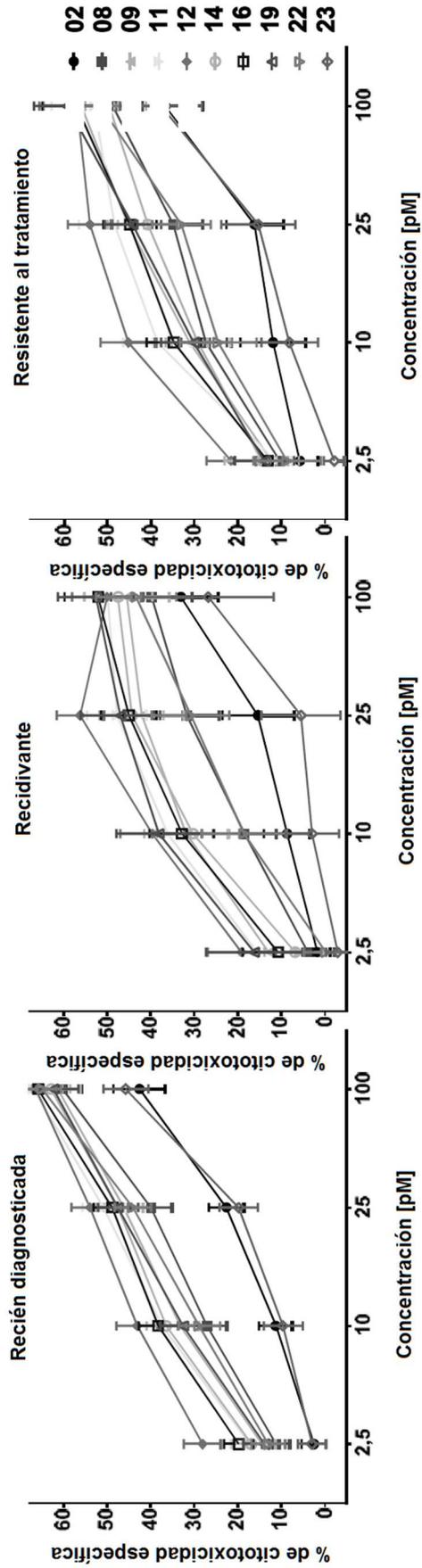


Figura 15