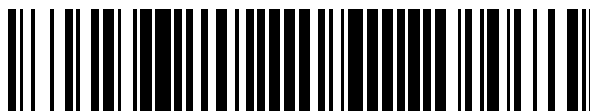


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 287**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2013 PCT/EP2013/050603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2013 E 13704369 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2802607**

54 Título: **Complementación funcional bipartita inducida por antígenos duales**

30 Prioridad:

**13.01.2012 EP 12151125**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG (100.0%)  
Sanderring 2  
97070 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

**STUHLER, GERNOT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 653 287 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

Complementación funcional bipartita inducida por antígenos duales

5 La presente invención se refiere a un conjunto de polipéptidos y a sus usos. En particular, la presente invención se refiere a un conjunto de polipéptidos según el cual este conjunto comprende dos polipéptidos cada uno de los cuales comprende un resto diana "T" que se une a un antígeno "A" y a un fragmento de "F" de un dominio funcional, en el que dichos dos polipéptidos no se asocian entre sí en ausencia de un sustrato que tiene "A" en (sobre) su superficie y en el que, al dimerizarse "F", el dímero resultante se vuelve funcional. Además, se describen los usos médicos y de diagnóstico de dicho conjunto. Igualmente, la presente invención se refiere a molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican dicho conjunto de polipéptidos. La presente invención también se refiere a un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican dicho conjunto de polipéptidos. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho conjunto de polipéptidos. Igualmente, la presente invención se refiere a un kit que comprende dicho conjunto de polipéptidos.

En los últimos años se ha observado un número de documentos de referencia que informan la eficacia destacada de construcciones de anticuerpos biespecíficas para terapia inmune de tumores *in vitro* y en pruebas pre-clínicas y clínicas tempranas. En la actualidad, está disponible un número sustancial de diferentes construcciones biespecíficas, que difieren en tamaño, composición, farmacocinética y capacidad para eliminar directamente células neoplásicas o para emplear células efectoras de la inmunidad para lisis celular tumoral.

Las estrategias de inmunidad al cáncer a base de anticuerpos son opciones terapéuticas altamente prometedoras debido a su excelente sensibilidad y especificidad hacia las estructuras diana.

La organización estructural modular y funcional de los anticuerpos permite la manipulación extensiva por la ingeniería genética. Los diferentes dominios similares a inmunoglobulina pueden separarse y/o unirse sin perder características funcionales asociadas al dominio específico. Además, pueden combinarse y enlazarse con dominios de proteína heterólogos pero también con porciones no peptídicas. Por lo tanto, es posible desarrollar construcciones de fusión en una manera racional desprovista de las limitaciones naturales de anticuerpos convencionales.

Las proteínas de fusión a base de anticuerpos pueden generarse con nuevas propiedades biológicas y/o farmacéuticas. Existen esfuerzos prometedores para modificar la capacidad del dominio Fc para producir ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) por mutagénesis, dependiente de la aplicación prevista, ya sea para reducir los efectos secundarios (mutaciones inhibitorias) o para mejorar la eficacia terapéutica (mutaciones de activación). Las nuevas aplicaciones que se vuelven posibles por ingeniería genética son incluso más variadas cuando se considera el dominio de unión a antígeno de los anticuerpos.

El antígeno que reconoce los dominios variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo, puede unirse por un conector peptídico a través de la ingeniería genética mientras conserva la capacidad de unión a antígeno. Tales fragmentos variables de cadena sencilla de unión a antígeno (scFvs) pueden utilizarse como sustitutos de anticuerpos pequeños con alta capacidad de penetración en el tejido y bajo tiempo de retención en suero para procedimientos de formación de imágenes clínicas y radioterapia y otras aplicaciones. De manera más importante, estas porciones de scFv pueden emplearse fácilmente como módulos específicos de antígeno en el desarrollo de nuevas terapias recombinantes.

Los informes recientes indican un tremendo potencial de los anticuerpos biespecíficos recombinantes en terapia anti-tumoral. Dichos anticuerpos biespecíficos reconocen dos antígenos, uno de los cuales se expresa por el tumor, mientras que el otro se encuentra habitualmente en una célula inmune. La mayoría de los anticuerpos biespecíficos en terapia anti-tumoral se dirigen a un marcador de linaje asociado al tumor por un lado y CD3 $\epsilon$ , una molécula invariable del compuesto del receptor de célula T/CD3 por el otro lado, reclutando de esta manera células T para destruir el tumor [Müller and Kontermann, Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010, 24(2):89-98].

A pesar de las opciones extensivas para manipular la función y estructura del anticuerpo, la eficacia terapéutica de dichos reactivos a base de anticuerpo se limita por la naturaleza del antígeno dirigido, la accesibilidad del antígeno en tumor y en tejidos asociados a tumor y la aptitud del anticuerpo para obtener o mediar una función que induce la muerte celular deseada.

Por ejemplo, cuando los pacientes se tratan con construcciones biespecíficas dirigidas contra antígenos también expresados en tejidos con funciones vitales, se observan efectos secundarios graves. Este es un problema grave, ya que, con la excepción de un número desconocido de moléculas de superficie celular individualmente mutadas y el receptor de célula B o T monoclonal en caso de linfomas, no están disponibles los antígenos específicos de tumor que discriminan una célula transformada de su progenitor saludable.

Ya que los conceptos terapéuticos basados en el uso de anticuerpos biespecíficos habitualmente se basan en el reclutamiento de células efectoras, parece que cuanto más efectiva sea la herramienta (construcción biespecífica), es más probable que ocurran los efectos secundarios, e incluso la expresión minuta de antígeno en tejido no transformado puede causar efectos fuera de la diana no controlables.

En 2008, SCIENCE publicó el primer informe acerca de la eficacia clínica del anticuerpo que emplea la célula T biespecífica (BiTE) de cadena única, MT103/blinatumomab; induce las remisiones en aproximadamente el 80 % de los pacientes con linfoma en recaída o resistentes a inmunoterapia convencional en niveles de suero de aproximadamente 5 órdenes de magnitud inferiores a los niveles de suero informados para el anticuerpo monoclonal, rituximab (Bargou, R. et al Science 321, 974-977, 2008). Esta publicación y los informes posteriores en las pruebas de fase II de confirmación en leucemia linfática aguda (ALL) dieron lugar a una nueva era de anticuerpos biespecíficos, hasta entonces en desaparición grave durante casi dos décadas debido a la toxicidad sistémica y poca o nada de actividad terapéutica. Principalmente en la secuela de ese artículo de SCIENCE, los anticuerpos biespecíficos se vuelven un campo en crecimiento de nuevo, en el cual se contaron más de 35 formatos diferentes (Reichert, *Drug Discov Today*. 17 (2012) 954-963). Estos formatos difieren en tamaño y se optimizan por afinidad al antígeno, estabilidad, capacidad para reclutar células efectoras (principalmente células T) y farmacocinéticas. La afinidad o avidéz de las construcciones se manipulan mediante maduración por afinidad utilizando diversas técnicas o simplemente al unir múltiples dominios de scFV en línea para crear una construcción multivalente. Incluso se informan anticuerpos trispecíficos que se diseñan para desplegar capacidades de unión mejoradas al dirigir dos en lugar de una molécula diana. La estabilidad de los formatos puede optimizarse al añadir dominios similares a inmunoglobulina para imitar los anticuerpos de origen natural y mejorar simultáneamente las propiedades farmacocinéticas como vida media prolongada en suero y protección de digestión proteolítica por proteasas. Igualmente, la estabilidad de los formatos puede mejorarse al optimizar la producción. Ya que las secuencias conectoras que se utilizan para unir covalentemente los dominios de scFV con frecuencia conducen a agregados, se han establecido líneas de producción que primero producen dos o tres polipéptidos que pueden reensamblarse fácilmente para generar un fármaco funcional. Tales técnicas utilizan puentes de disulfuro dirigidos o reactivos de reticulación para unir covalentemente dos polipéptidos diferentes. Otras técnicas hacen uso de dominios de hetero-u homo-dimerización como dominios de cremallera de leucina, dominios Fc y otros como perilla en tecnologías de agujero (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/062466). Igualmente, las interacciones de  $V_H$  y  $V_L$ , que pueden estabilizarse por la unión del antígeno, se han utilizado en los así llamados inmunoensayos sándwich abiertos para la detección del antígeno (Ueda, *Nature Biotechnology* 14 (1996), 1714-1718; Ohmuro-Matsuyama (2012) Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich Immunoassay, Integrative Proteomics, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), ISBN: 978-953-51-0070-6; WO 2004/016782/EP-A1 1536005).

Sin embargo, las construcciones bi/trispecíficas y bi o multivalentes escritas en la técnica tienen desventajas. Primero, la ausencia de antígenos de tumor realmente específicos que pueden dirigirse como molécula diana. De hecho, cuanto más potente sea el formato de anticuerpo biespecífico, más graves serán los daños colaterales, debido a que los antígenos diana dirigidos hasta ahora son antígenos de diferenciación compartidos por tumores y células no malignas. En consecuencia, los formatos bi- o tri-específicos de la técnica anterior no pueden discriminar las células malignas de no las no malignas. En este aspecto, las construcciones tri-específicas, desarrolladas para alta avidéz uniéndose a células dirigidas, pueden formarse para conferir un alto grado de efectos fuera del diana debido a la unión de una molécula diana en general suficiente para reclutar células inmunes para destrucción de una célula que expresa cualquier molécula diana. De esta manera, construcción tri-específica mejora la avidéz en el costo de especificidad. Los análisis de múltiples parámetros recientes indican que las células de tumor pueden distinguirse de sus tejidos no transformados respectivos de origen debido a la expresión de firmas de antígeno aberrantes. En la actualidad, estos descubrimientos constituyen una parte integral del sistema de clasificación de la Organización Mundial de Salud (OMS) de neoplasmas hematopoyéticos, y también se mantiene real para cáncer y células que inician cáncer o madre de cáncer de otra procedencia. De esta manera, sería ventajoso que las células dirigidas que expresan simultáneamente una combinación de antígenos que juntos significan un estado maligno. Ninguno de los anticuerpos descritos por la técnica anterior es capaz de discriminar entre células que expresan una combinación de antígenos dirigidos de células positivas de antígeno único. Segundo, un problema principal de tecnologías de anticuerpo biespecífico que usan, por ejemplo, moléculas CD3 completas (por ejemplo, un scFv anti Cd3) es la capacidad inherente de estas proteínas ara estimula o pre-estimular las células T independientemente de la unión al antígeno dirigido en células dirigidas y muchos efectos secundarios observados hasta ahora parecen asociarse con función de célula T errante.

También los Demibodies<sup>TM</sup> como se desvelan en el documento WO2007/062466 y como se hacen referencia en la cita de Internet de BIOLINK PARTNERS LTD (Bio-Link: Demibodies<sup>TM</sup>: Dimerization-activated therapeutic antibodies; 2007; URL: <http://biolink.org.au/library/File/Demibodies.pdf>) podrían dar lugar a una actividad indeseada. Debido a su carácter técnico (por ejemplo la presencia de cremalleras de leucina) un par de Demibodies<sup>TM</sup> podría formar un dímero incluso en ausencia de su diana, es decir, en ausencia de una superficie celular que lleve ambos antígenos a los que los dos miembros del par de Demibodies<sup>TM</sup> se unen. Por lo tanto, los Demibodies<sup>TM</sup> también pueden dar lugar a una activación indeseada de las funciones efectoras a aplicarse.

Igualmente, también el par de sondas FRET como se desvelan en el documento WO2004/042404 podría dar lugar a una actividad de falso positivo. Cada miembro de dicho par de sondas comprende un anticuerpo unido a biotina y un

fluorocromo (miembro de un par FRET). Una vez que la avidina está presente, las sondas forman un dímero y se da una señal FRET. De nuevo, esta señal FRET podría darse incluso en ausencia de la diana del par de sondas FRET que lleva los dos antígenos a los que los anticuerpos comprendidos se unen.

5 Lo mismo se aplica al par marcado con variante de GFP de scFV como se desvela en Ohiro (ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EE.UU., 74, 22, 2002, 5786-5792) que también hace uso de un par de cremalleras de leucina.

10 Las tecnologías descritas anteriormente también requieren componentes adicionales (cremalleras de leucina, biotina/avidina etc.) además de sus dominios funcionales.

15 De esta manera, hay una necesidad en la técnica de opciones de tratamiento más específicas en el tratamiento de cáncer, en particular hay una necesidad de maneras mejoradas para identificar y/o eliminar células cancerígenas con especificidad más alta y reducir efectos secundarios.

20 Existen necesidades similares en el campo de trasplante alogénico de células madre, es decir, el trasplante de células madre obtenidas de otra persona a un paciente. Un paciente que padece de leucemia en recaída o resistente u otra enfermedad hematológica puede tratarse por quimioterapia/irradiación (para eliminar las células hematopoyéticas malignas) en combinación con un trasplante de células hematopoyéticas saludables de un donante. Si está incompleta la eliminación de células malignas, el tumor puede crecer de nuevo a partir de las células receptoras malignas supervivientes a pesar de la presencia de células saludables proporcionadas por el trasplante. Como un resultado, se reducen significativamente las tasas de supervivencia entre pacientes que experimentan tratamiento de tumor y trasplante alogénico.

25 Sin embargo, es difícil eliminar (y, de manera similar, identificar) las células malignas supervivientes con alta especificidad, y de esta manera a pesar de varios intentos, no se han encontrado buenas soluciones a este problema. De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad en la materia de proporcionar maneras mejoradas para identificar y/o eliminar específicamente tales células receptoras malignas con efectos secundarios mínimos en otras células.

30 El injerto (células madre alogénicas), dado poco después de la terapia de acondicionamiento (radiación/quimioterapia) puede reemplazar y reconstituir la hematopoyesis. El injerto se recolecta de ya sea médula ósea o de glóbulos periféricos estimulados y contiene aproximadamente un por ciento de células madre hematopoyéticas que son la fuente de glóbulos recientemente formados. Además, el injerto normalmente contiene un número enorme de células inmunes, especialmente linfocitos T, que son parte del sistema inmune adoptivo y que pueden ser muy benéficos en casos donde estas células T montan un ataque inmune contra células de leucemia. Esta situación se describe y conoce bien como efecto de injerto contra leucemia. Por el otro lado, también se observa frecuentemente una respuesta inmune errante que dirige las células T contra el paciente, conocida como enfermedad de injerto contra hospedador.

35 40 Para minimizar la enfermedad de injerto contra hospedador, los injertos se seleccionan habitualmente en la base de HLA (antígeno leucocitario humano) o MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). Cuanto más cercanos son los antígenos entre donante y receptor, más baja será la probabilidad de enfermedad grave de injerto contra hospedador. Sin embargo, para muchos pacientes, no puede encontrarse un injerto que coincida completamente. En estos casos, se utilizan células madre de sangre periférica o médula ósea que difieren en una o incluso más molécula HLA. Esta situación clínica requiere un régimen inmunosupresor estricto después del trasplante para mantener el sistema de célula T estrictamente bajo control.

45 50 Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar maneras mejoradas para identificar y/o eliminar específicamente clases específicas de células. Igualmente, es un objeto de la presente invención proporcionar maneras mejoradas para identificar y/o eliminar específicamente células que tienen una combinación específica de dos antígenos específicos en su superficie celular. Adicionalmente, es un objeto de la presente invención proporcionar maneras mejoradas para identificar y/o eliminar específicamente células cancerosas. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar maneras mejoradas para identificar y/o eliminar específicamente células que (1) son de un cierto origen (tal como, en la situación de un trasplante de célula o tejido, células que se originan del receptor o donante) y que (2) pertenecen a un tipo celular específico o linaje celular (tales como células hematopoyéticas).

55 60 Los objetos de la presente invención se resuelven por un conjunto de polipéptidos que comprende:

un primer polipéptido P1 que comprende

(i) un resto diana T1,

en el que dicho resto diana T1 se une específicamente a un antígeno A1, y

(ii) un fragmento F1 de un dominio funcional F,

65 en el que ni dicho fragmento F1 por sí mismo ni dicho polipéptido P1 por sí mismo son funcionales con respecto a la función de dicho dominio F,

y

un segundo polipéptido P2 que comprende

(i) un resto diana T2,

en el que dicho resto diana T2 se une específicamente a un antígeno A2, y

(ii) un fragmento F2 de dicho dominio funcional F,

en el que ni dicho fragmento F2 por sí mismo ni dicho polipéptido P2 por sí mismo son funcionales con respecto a la función de dicho dominio F,

en el que dicho antígeno A1 es diferente de dicho antígeno A2,

en el que dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no se asocian entre sí en la ausencia de una célula que tiene ambos antígenos, A1 y A2, en o sobre su superficie celular, más específicamente una célula que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en o sobre su superficie celular, y

en el que, al dimerizarse dicho fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con dicho fragmento F2 de dicho polipéptido P2, el dímero resultante es funcional con respecto a la función de dicho dominio F y

en el que

dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_L$  de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_H$  del mismo anticuerpo; o en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo.

Se desvelan en el presente documento los siguientes artículos:

1. Un conjunto de polipéptidos que comprende:

un primer polipéptido P1 que comprende

(i) un resto diana T1,

en el que dicho resto diana T1 se une específicamente a un antígeno A1, y

(ii) un fragmento F1 de un dominio funcional F,

en el que ni dicho fragmento F1 por sí mismo ni dicho polipéptido P1 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio F,

y

un segundo polipéptido P2 que comprende

(i) un resto diana T2,

en el que dicho resto diana T2 se une específicamente a un antígeno A2, y

(ii) un fragmento F2 de dicho dominio funcional F,

en el que ni dicho fragmento F2 por sí mismo ni dicho polipéptido P2 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio F,

en el que dicho antígeno A1 es diferente de dicho antígeno A2,

en el que dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no se asocian entre sí en la ausencia de un sustrato que tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie, más específicamente un sustrato que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular, y

en el que, al dimerizarse dicho fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con dicho fragmento F2 de dicho polipéptido P2, el dímero resultante es funcional con respecto a la función de dicho dominio F.

2. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con el artículo 1, en el que una célula que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2, mientras que una célula que no lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular no induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2.

3. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con el artículo 1 o 2, en el que dicho resto diana T1 comprende un módulo de inmunoglobulina, preferentemente un módulo de inmunoglobulina I1 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , más preferentemente un módulo de inmunoglobulina I1 que comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo, o un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio variable  $V_{HH}$  de un anticuerpo de llama, anticuerpo de camello o anticuerpo de tiburón, y/o dicho resto diana T2 comprende un módulo de inmunoglobulina, preferentemente un módulo de inmunoglobulina I2 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , más preferentemente un módulo de inmunoglobulina I2 que comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo, o un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio variable  $V_{HH}$  de un anticuerpo de llama, anticuerpo de camello o anticuerpo de tiburón, o en el que dicho resto diana T1 y/o dicho resto diana T2 comprende un aptámero o un ligando natural de dicho antígeno A1 o antígeno A2, respectivamente.

4. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor o en la superficie de células progenitoras/precursoras de un tumor, preferentemente un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor hematológico o un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor no hematológico.

5. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 solamente se encuentra en células cancerosas, y no en células que no son cancerosas, y en el que, preferentemente, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 es específica para células cancerosas de

un cierto tipo de cáncer.

- 5 6. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho antígeno A1 es un antígeno MHC, preferentemente una variante alélica de cualquiera de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DR, o HLA-DM, más preferentemente una variante alélica de una molécula MHC de clase I, más preferentemente una variante alélica seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4, y HLA-Cw7, y/o dicho antígeno A2 es un antígeno que es específico para un cierto tipo celular o linaje celular.
- 10 7. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho dominio funcional F es un módulo de inmunoglobulina, preferentemente un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo, o una molécula fluorescente, preferentemente GFP o una variante GFP, o una molécula capaz de mediar bioluminiscencia, preferentemente luciferasa de *Gaussia*.
- 15 8. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula portadora, preferentemente una molécula portadora que es un péptido o una molécula de carbohidrato, o una etiqueta de afinidad, preferentemente una etiqueta de afinidad seleccionada del grupo que consiste en una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST), una etiqueta de hemaglutinina (HA), una etiqueta de polihistidina (His) y una etiqueta de proteína de unión de maltosa (MBP).
- 20 9. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a un compuesto radiactivo, un dominio que se une específicamente a una molécula de toxina que por sí misma no es capaz de penetrar a través de la membrana celular de una célula de humano y que se interioriza en una célula de humano al asociar con la membrana celular de dicha célula, un dominio que se une específicamente a una molécula fluorescente, o un dominio que se une específicamente a una molécula capaz de mediar bioluminiscencia.
- 25 10. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_L$  de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_H$  del mismo anticuerpo, en el que, preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3, o en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo, en el que, preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3.
- 30 11. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores para utilizarse en el tratamiento de un paciente quien padece de un tumor o para uso de diagnóstico en un paciente quien padece de un tumor, preferentemente para utilizarse en el tratamiento de un paciente quien padece de un tumor y que experimenta trasplante alogénico de célula o tejido o significa que experimenta tal trasplante o para uso de diagnóstico en un paciente quien padece de un tumor y que experimenta o significa que experimenta trasplante alogénico de célula o tejido, en el que, preferentemente, dicho conjunto de polipéptidos se administra a dicho paciente.
- 35 12. Una molécula de ácido nucleico o un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifica el conjunto de polipéptidos o uno de los polipéptidos del conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores.
- 40 13. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el artículo 12 o la secuencia de una de las moléculas de ácido nucleico del conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con el artículo 12.
- 45 14. Una composición farmacéutica que comprende ya sea el conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 11 o la molécula de ácido nucleico/conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con el artículo 12 o el vector de acuerdo con el artículo 13, en el que, preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 15. Un kit que comprende el conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-11.

Preferentemente, dicho antígeno A1 es una molécula de superficie celular. Preferentemente, dicho antígeno A2 es una molécula de superficie celular. Preferentemente, dicho antígeno A1 es específico para el estado maligno de una célula. Preferentemente, dicho antígeno A2 es específico para un cierto tipo celular o linaje celular o para el estado maligno de una célula. Preferentemente, dicho antígeno A1 es específico para un tipo celular maligno. Preferentemente, dicho antígeno A2 es específico para un tipo celular maligno.

En un aspecto, la presente invención se refiere al conjunto de polipéptidos como se define y describe en la presente, en el que, sin embargo, el antígeno A1 es el mismo que el antígeno A2. Por consiguiente, en tal un conjunto de polipéptidos P1 y P2, el fragmento F1 puede unirse a la porción dirigida T1 y el fragmento F2 puede unirse a la porción dirigida T2, mientras que tanto T1 como T2 se unen específicamente al mismo antígeno. En este contexto, el

epítopo en el antígeno A1, al cual se une la porción dirigida T1, puede ser el mismo o un epítopo diferente que el epítopo en el antígeno A2, al cual se une la porción dirigida T2. En el caso donde el epítopo en el antígeno A1 es el mismo que el epítopo en el antígeno A2, el polipéptido P1 puede comprender un resto diana que es idéntica a la porción dirigida comprendida en P2. También este aspecto de la invención se basa en la ventaja que el conjunto de polipéptidos P1 y P2 con el dominio F interrumpido despliega efectos no fuera del diana (por ejemplo sin pre-activación de Células T que despliegan CD3 y, por consiguiente, efectos secundarios y/o propiedades menos tóxicas, por ejemplo en comparación con anticuerpos biespecíficos convencionales).

En el contexto de la invención, dicho fragmento F1 y dicho fragmento F2 juntos son dicho dominio funcional F.

En una realización, dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no están unidos covalentemente entre sí en la ausencia de un sustrato que tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie, más específicamente una célula que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular.

En una realización, dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no están unidos covalentemente entre sí.

Dicho polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, dicho fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, no se asocian entre sí, en particular cuando se administran a un sujeto en necesidad de intervención médica. Es decir, en necesidad de terapia y/o diagnóstico. De acuerdo con lo anterior, los medios de diagnóstico o farmacéuticos proporcionados en el presente documento comprenden los dos polipéptidos P1 y P2 como se comprende en los mismos, definido "conjunto de polipéptidos" en forma no asociada. La asociación de dichos dos polipéptidos tiene lugar *in vivo* bajo la presencia de dicho sustrato o célula. Bajo la presencia de dicho sustrato o célula, la asociación de dichos dos polipéptidos puede estabilizarse (además) por un agente estabilizador (por ejemplo un antígeno, como, por ejemplo, CD3, HIS o DIG como se describe en la presente). Preferentemente, no se asocian entre sí en la ausencia de dicho sustrato o célula y/o no se dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula. Más preferentemente, no se asocian entre sí en la ausencia de dicho sustrato o célula y/o no se dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula incluso si un agente está presente, que estabiliza la asociación y/o dimerización de polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2, es decir, incluso si dicho polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, dicho fragmento F1 y fragmento F2 está presente en un complejo trimérico de agente estabilizador/P1(F1)/P2(F2) (por ejemplo en un complejo trimérico de antígeno/VH/VL).

En el contexto de la invención, dicho polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, dicho fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, se asocian entre sí y/o dimerizan en una formación de complejo de tres partes, preferentemente por una interacción mediada por un agente que estabiliza la asociación y/o dimerización de polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 (por ejemplo por una interacción mediada por antígeno), en el que esta asociación y/o dimerización solamente ocurre en la presencia de dicho sustrato o célula.

La fuerza de afinidad con la cual, por ejemplo, cremalleras de leucina y/o dominios constantes, como fragmentos Fc o CH3 de inmunoglobulina, se hetero- y homodimerizan, se estima que está a una constante de disociación  $K_D$  en el intervalo de  $\sim 10^{-8}$  a  $10^{-11}$  M (véase, por ejemplo, Zhu (1997) Protein Sci. 6, 781-8; Plückthun (1997) Immunotech. 3, 83-105). Este intervalo  $K_D$  está claramente debajo de la  $K_D$  con la cual, en la ausencia de dicho sustrato o célula, la asociación y/o dimerización de dichos polipéptidos P1 y P2, en particular de dichos fragmentos F1 y F2, de esta invención puede ocurrir. Por consiguiente, en una realización, el polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, se asocian entre sí y/o dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula solamente con una  $K_D$  que está por encima de la  $K_D$  de, por ejemplo, hetero- y homodimerización de cremalleras de leucina y/o dominios constantes, como fragmentos Fc o CH3 de inmunoglobulina. En la presencia de dicho sustrato o célula, se contempla que el polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, se asocian entre sí y/o dimerizan con una  $K_D$  que está en el intervalo de la  $K_D$  de, por ejemplo, hetero- y homodimerización de cremalleras de leucina y/o dominios constantes, como fragmentos Fc o CH3 de inmunoglobulina, o incluso debajo de este intervalo.

La fuerza de interacción de, por ejemplo, dominios VH y VL aislados, en general, es de baja afinidad. Utilizando espectroscopia de diferencia ultravioleta, fluorométrica o calorimétrica y/o técnicas de dicroísmo circular, se han determinado constantes de disociación  $K_D$  de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M (véase, por ejemplo, Wörn JMB (2001) 305, 989-1010; Plückthun (1992) Immunological Reviews No 130). Utilizando técnicas de resonancia de plasmón de superficie (biosensor SPR BIAcore o BIAcore 2000, Pharmacia) y un sistema Anticuerpo anti HEL (anticuerpo anti-lisozima de huevo de gallina HyHEL-10), Ueda (loc. cit.) y Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.) encontraron que los dominios VH y VL aislados no se dimerizan del todo ( $K_a < 10^5/M$ , debajo del límite de detección). Sin embargo, la asociación de los péptidos VH y VL se mejoró significativamente en la presencia de antígenos similares ( $K_a \sim 10^9/M$ ) con una reducción remarcable de la tasa de disociación del complejo trimérico de antígeno/VH/VL con una  $K_d$  calculada  $\sim 2.73 \times 10^{-5} \pm 1.43 \times 10^{-6}$  /s a  $1.4 \mu M$  del antígeno. Por consiguiente, se contempla particularmente en el contexto de esta invención que la  $K_D$  con la cual, en la ausencia de dicho sustrato o célula, la asociación y/o dimerización de

dichos polipéptidos P1 y P2, en particular de dichos fragmentos F1 y F2, de esta invención puede ocurrir, está solamente en, o incluso arriba de, la  $K_D$  o intervalo de  $K_D$  de dominios  $V_H$  y  $V_L$  aislados, por ejemplo como se ha estimado en el contexto de Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) y Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.), en particular por encima de la  $K_D$  o intervalo de  $K_D$  del complejo trimérico de antígeno/ $V_H/V_L$  como se ha estimado en el contexto de Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) y Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.). En la presencia de dicho sustrato o célula, se contempla que el polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, se asocian entre sí y/o dimerizan con una  $K_D$  que está (lejos) debajo de la  $K_D$  o intervalo de  $K_D$  de dominios  $V_H$  y  $V_L$  aislados, por ejemplo como se ha estimado en el contexto de Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) y Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.), preferentemente en, o incluso debajo de, la  $K_D$  o intervalo de  $K_D$  del complejo trimérico de antígeno/ $V_H/V_L$  como se ha estimado en el contexto de Plückthun (loc. cit.), Ueda (loc. cit.) y Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.).

En un aspecto, polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, no están asociados en la ausencia de dicho sustrato o célula y/o no se dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula. Si del todo, se asocian entre sí y/o dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula solamente con una  $K_D$  por encima de  $10^{-8}$  M, preferentemente por encima de  $10^{-6}$  M, más preferentemente por encima de  $10^{-5}$  M y más preferentemente por encima de  $10^{-4}$  M. En otro aspecto, si del todo, se asocian entre sí y/o dimerizan en la ausencia de dicho sustrato o célula solamente con una  $K_D$  en el intervalo de  $10^{-8}$  M a  $10^{-2}$  M, preferentemente  $10^{-7}$  M a  $10^{-3}$  M, más preferentemente  $10^{-6}$  M a  $10^{-3}$  M e incluso más preferentemente  $10^{-5}$  M a  $10^{-3}$  M. En otro aspecto, polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2 como se comprenden en los mismos, más particular  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos, se asocian en la presencia de dicho sustrato o célula y/o dimerizan en la presencia de dicho sustrato o célula. En particular, se asocian entre sí y/o dimerizan en la presencia de dicho sustrato o célula con una  $K_D$  debajo de  $10^{-6}$  M, preferentemente debajo de  $10^{-7}$  M, más preferentemente debajo de  $10^{-8}$  M y más preferentemente debajo de  $10^{-9}$  M. También pueden asociarse entre sí y/o puede dimerizarse en la presencia de dicho sustrato o célula con una  $K_D$  en el intervalo de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M, más preferentemente  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M e incluso más preferentemente  $10^{-11}$  M a  $10^{-8}$  M.

En una realización preferida, lo anterior incluso se aplica en caso donde un agente está presente, el cual estabiliza la asociación y/o dimerización de polipéptido P1 y polipéptido P2 y/o, en particular, fragmento F1 y fragmento F2. Por ejemplo, tal un agente estabilizador de acuerdo con esta invención puede ser un antígeno, como, por ejemplo, CD3, HIS o DIG como se describe en la presente, capaz de unirse al dominio F que, por ejemplo, puede comprender  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo (F1 y F2, respectivamente, o F2 y F3, respectivamente).

Estando "presente", en el contexto de esta invención y, en particular, en el contexto de lo anterior (es decir, con respecto a dicho agente y/o dicho sustrato o célula y/o dichos antígenos A1 y A2), particularmente significa estando presente en una concentración en un intervalo de 0.01  $\mu$ M a 1 mM, en un intervalo de 0.1 a 500  $\mu$ M, en un intervalo de 0.1 a 300  $\mu$ M, en un intervalo de 0.1 a 100  $\mu$ M, en un intervalo de 1 a 500  $\mu$ M, en un intervalo de 10 a 500  $\mu$ M. Estando "ausente", en el contexto de esta invención y, en particular, en el contexto de arriba (es decir, con respecto a dicho agente y/o dicho sustrato o célula y/o dichos antígenos A1 y A2), particularmente significa estando presente en una concentración debajo de los intervalos anteriores o debajo de 1 mM, 500  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.001  $\mu$ M o 1 nM en el que se prefieren los valores inferiores.

La persona experta en la materia está fácilmente en la posición para medir la  $K_D$  de dimerización, en particular, de P1 y P2, más particular de F1 y F2 como se comprenden en los mismos, más particular de  $V_H$  y  $V_L$  que pueden comprenderse en los mismos. Los ejemplos de métodos de medición respectivos son cristalografía de rayos x; resonancia magnética nuclear (NMR); calorimetría isotérmica (ITC); criomicroscopía electrónica (CEM); espectrometría de masa (MS); resonancia de plasmones de superficie (SPR). Tales métodos son, por ejemplo, descritos en Protein Surface Recognition: Approaches for Drug Discovery: Approaches for the Inhibition of Protein-Protein Interactions for Drug Discovery (Eds: Ernest Giralt, Mark Pecuh, Xavier Salvatella John Wiley & Sons; 12 de Noviembre de 2010). Los ejemplos adicionales de métodos de medición respectivos son Análisis de Dicroísmo circular; Cromatografía de Filtración en Gel de Zona pequeña; Retardo en Gel de Fluorescencia; Equilibrio de Sedimentación; Ensayo de Polarización de Fluorescencia; Análisis Far Western Blot o Blot Overlay; Análisis de Electroforesis Capilar por Afinidad; Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET); tales métodos, por ejemplo se describen en Protein-Protein Interactions: Methods and Applications: 261 (Methods in Molecular Biology); Haiyan Fu (Editor); Humana Press; 1 (23 de Marzo de 2004). Un método preferido para medir la  $K_D$  de acuerdo con esta invención es Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS). Este método, por ejemplo, se describe en Douglas Magde (Physical Review Letters 29, 11, 1972, S. 705-708).

En un aspecto particular, las  $K_D$  referidas en el presente documento (i) se aplican a, (ii) están a o (iii) están por medirse a una temperatura de 4 a 38 °C, preferentemente 4 a 20 °C (por ejemplo 10 °C) o 20 a 38 °C (por ejemplo 30 °C), y/o un pH de 4,5 a 8 (por ejemplo un pH de 7).



“No asociado” en el contexto de la presente invención particularmente significa no asociado funcionalmente con respecto de la función del dominio F, es decir, no permitiendo a F1 y F2 formar un F funcional. Por consiguiente, en un aspecto de la invención, P1 y P2 pueden unirse entre sí (por ejemplo covalentemente) en cuanto a que ningún dominio funcional F se forma por F1 y F2. Sin embargo, se prefiere que P1 y P2 se separen.

5 En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es una molécula.

En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es proteico.

10 En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 no es proteico.

En una realización, dicho resto diana T1 se une no covalentemente a dicho antígeno A1.

15 En una realización, dicho resto diana T2 se une no covalentemente a dicho antígeno A2.

Se describe en el presente documento que un sustrato que tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2, mientras que un sustrato que no tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular no induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2.

20 En el contexto de la invención, una célula que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2, mientras que una célula que no lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular no induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2. En este contexto “induce dimerización” particularmente significa “permite la yuxtaposición y dimerización subsiguiente”.

En una realización, dicho resto diana T1 comprende un módulo de inmunoglobulina y/o dicho resto diana T2 comprende un módulo de inmunoglobulina.

30 En una realización, dicho resto diana T1 comprende un módulo de inmunoglobulina I1 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , preferentemente un módulo de inmunoglobulina I1 que comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo, un Fab o a  $F(ab')_2$  (por ejemplo con partes adicionales de, por ejemplo, un dominio Fc) de un anticuerpo o un anticuerpo completo, y/o dicho resto diana T2 comprende un módulo de inmunoglobulina I2 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , preferentemente un módulo de inmunoglobulina I2 que comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo, un Fab o un  $F(ab')_2$  (por ejemplo con partes adicionales de, por ejemplo, un dominio Fc) de un anticuerpo o un anticuerpo completo.

40 En una realización, dicho resto diana T1 y/o dicho resto diana T2 comprende un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio variable  $V_{H/H}$  de un anticuerpo de llama, un anticuerpo de camello, o un anticuerpo de tiburón.

45 En una realización, dicho resto diana T1 y/o dicho resto diana T2 es un aptámero, o un ligando natural de dicho antígeno A1 o antígeno A2, respectivamente.

En una realización, dicho resto diana T1 y/o dicho resto diana T2 comprende un Fv o scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo.

50 En una realización, el módulo de inmunoglobulina comprendido en la porción dirigida T1 y T2 comprende un dominio V seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un dominio V de un anticuerpo anti-HLA-A2 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 78 y 79 (CDR 1 y 3) y DAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 75-77 (CDR 1-3);
- 55 (ii) un dominio V de un anticuerpo anti-HLA-Cw6 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 83 y 84 (CDR 1 y 3) y DDS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 80-82 (CDR 1-3);
- (iii) un dominio V de un anticuerpo anti-EpCAM que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 88 y 89 (CDR 1 y 3) y WAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 85-87 (CDR 1-3);
- (iv) un dominio V de un anticuerpo anti-Her2 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 93 y 94 (CDR 1 y 3) y SAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 90-92 (CDR 1-3);
- 60 (v) un dominio V de un anticuerpo anti-EGFR1 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 98 y 99 (CDR 1 y 3) y DAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 95-97 (CDR 1-3);
- (vi) un dominio V de un anticuerpo anti-CEA que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 103 y 104 (CDR 1 y 3) y SAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 100-102 (CDR 1-3);
- 65 (vii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD45 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 107 y 108 (CDR 1 y 3) y LAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 105 y 106 (CDR 1 y 2) y CDR3 o SEQ ID NO: 132-134 (CDR 1-3);

- (viii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD138 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 112 y 113 (CDR y 1 y 3) y YTS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 109-111 (CDR 1-3); y  
 (ix) un dominio V de un anticuerpo anti-CD19 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende SEQ ID NO: 158 y 159 (CDR 1 y 3) y DAS (CDR 2) y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 155-157 (CDR 1-3).

5 En una realización preferida adicional, el módulo de inmunoglobulina comprendido en la porción dirigida T1 y/o T2 comprende un dominio V seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un dominio V de un anticuerpo anti-HLA-A2 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 52 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 51;  
 (ii) un dominio V de un anticuerpo anti-HLA-Cw6 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 54 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 53;  
 (iii) un dominio V de un anticuerpo anti-EpCAM que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 56 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 55;  
 15 (iv) un dominio V de un anticuerpo anti-Her2 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 58 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 57;  
 (v) un dominio V de un anticuerpo anti-EGFR1 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 60 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 59;  
 (vi) un dominio V de un anticuerpo anti-CEA que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 62 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 61;  
 20 (vii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD45 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 64 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 63; y  
 (viii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD138 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 66 y/o un dominio  $V_H$  que comprende SEQ ID NO: 65;  
 25 (ix) un dominio V de un anticuerpo anti-CD19 que comprende un dominio  $V_L$  que comprende la SEQ ID NO: 153 y/o un dominio  $V_H$  que comprende la SEQ ID NO: 152.

En una realización preferida adicional, el módulo de inmunoglobulina comprendido en la porción dirigida T1 y/o T2 comprende un dominio V que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 67-74 y 154.

30 En una realización, polipéptido P1 tiene la estructura general F1-T1 y/o polipéptido P2 tiene la estructura general F2-T2. Las porciones de fragmento F y T pueden separarse por un conector (por ejemplo, F1-conector-T1 y/o F2-conector-T2) y/o flanquearse por (un) tramo(s) de aminoácido adicional(es) 1 y/o 2 (tramo-F1-(conector)-T1-tramo2 y/o tramo1-F2-(conector)-T2-tramo2). Se prefiere que la estructura general de arriba es del término N al término C de los polipéptidos, es decir, N-F1-T1-C y/o N-F2-T2-C, N-F1-conector-T1-C y/o N-F2-conector-T2-C y N-tramo1-F1-(conector)-T1-tramo2-C y/o N-tramo1-F2-(conector)-T2-tramo2-C. En el caso donde la porción dirigida es o comprende un módulo de inmunoglobulina I, como un Fv o scFv, el polipéptido P1 puede tener la estructura general F1-VH1-VL1 y/o el polipéptido P2 puede tener la estructura general F2-VH2-VL2 o el polipéptido P1 puede tener la estructura general F1-VL1-VH1 y/o el polipéptido P2 puede tener la estructura general F2-VL2-VH2. También en estos casos las porciones de fragmento F y T pueden separarse por un conector (por ejemplo, F1-conector-VH/VL1-VL/VH1 y/o F2-conector-VH/VL2-VL/VH2) y/o flanquearse por (un) tramo(s) de aminoácido adicional (es) 1 y/o 2 (tramo1-F1-(conector)-VH/VL1-VL/VH1-tramo2 y/o tramo1-F2-(conector)-VH/VL2-VL/VH2-tramo2). También en este caso, se prefiere que la estructura general de arriba sea del término N al término C de los polipéptidos, es decir, N-F1-VH/VL1-VL/VH1-C y/o N-F2-VH/VL2-VL/VH2-C, N-F1-conector-VH/VL1-VL/VH1-C y/o N-F2-conector-VH/VL2-VL/VH2-C y N-tramo1-F1-(conector)-VH/VL1-VL/VH1-tramo2-C y/o N-tramo1-F2-(conector)-VH/VL2-VL/VH2-tramo2-C. También puede estar presente un conector entre VH y VL o VL y VH.

El conector descrito arriba, en particular entre los dominios V, puede comprender 1 a 25 aminoácidos, preferentemente 12 a 20 aminoácidos, preferentemente 12 a 16 o 15 a 20 aminoácidos. El conector descrito arriba puede comprender uno o más motivos ( $G_3S$ ) y/o ( $G_4S$ ), en particular 1, 2, 3, 4, 5 o 6 motivos ( $G_3S$ ) y/o ( $G_4S$ ), preferentemente 3 o 4 motivos ( $G_3S$ ) y/o ( $G_4S$ ), más preferentemente 3 o 4 motivos ( $G_4S$ ).

55 En una realización, dicho módulo de inmunoglobulina I1 y dicho fragmento F1 se separan por un conector que comprende 1 a 12, preferentemente 3 a 12, aminoácidos, y/o dicho módulo de inmunoglobulina I2 y dicho fragmento F2 se separan por un conector que comprende 1 a 12, preferentemente 3 a 12, aminoácidos.

En una realización, el dominio  $V_L$  de I1 está unida al dominio  $V_H$  de I1 por un conector que comprende 12 a 25 aminoácidos, preferentemente un conector con la secuencia ( $G_3S$ )<sub>3</sub> o ( $G_3S$ )<sub>4</sub> o ( $G_4S$ )<sub>3</sub> o ( $G_4S$ )<sub>4</sub> y/o el dominio  $V_L$  de I2 está unida al dominio  $V_H$  de I2 por un conector que comprende 12 a 25 aminoácidos, preferentemente un conector con la secuencia ( $G_3S$ )<sub>3</sub> o ( $G_3S$ )<sub>4</sub> o ( $G_4S$ )<sub>3</sub> o ( $G_4S$ )<sub>4</sub>.

Como se menciona, el conector como se describe arriba puede comprender motivos ( $G_3S$ ) y/o ( $G_4S$ ). Los conectores alternativos pueden consistir de o comprender el motivo GEGTSTGSGGSGGSGGAD. La persona experta en la materia puede, sin más, encontrar y utilizar conector de (péptido) adicional conocido en la técnica.

65

Dichos tramos de aminoácido adicionales 1 y/o 2 pueden consistir de o comprender 1 a 200, 1 a 100, 1 a 70, 1 a 65, 1 a 50, 1 a 25 o 1 a 20 aminoácidos.

5 En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor o en la superficie de células progenitoras/precursoras de un tumor, preferentemente un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor hematológico, más preferentemente un antígeno expresado en la superficie de células seleccionadas del grupo que consiste en células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia linfática aguda, células de leucemia linfática crónica, células de linfoma, células de síndrome mieloproliferativo, células mielodisplásticas, más preferentemente células de mieloma,  
 10 o dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor no hematológico, preferentemente una célula seleccionada del grupo que consiste en células de carcinoma celular renal, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de pulmón, células de mesotelioma, células de cáncer de próstata, células de cáncer de cerebro, células de cáncer de hueso, células de sarcoma, células de cáncer de tejido suave, células de cáncer de ovario, células de cáncer de cérvix, células de cáncer de mama, células de cáncer endometrial, células de cáncer uterino, células de tumor de célula germinal, células de cáncer anal, células de carcinoma rectal, células de carcinoma de colon, células de carcinoma de intestino delgado, células de carcinoma gástrico, células de tumor de estroma gastrointestinal, células de carcinoma de hígado, células de carcinoma de páncreas, células de carcinoma del ducto biliar, células de carcinoma de vesícula biliar, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer hipofaríngeal, células de cáncer laríngeal, células de un cáncer del esófago, células de  
 20 cáncer de piel, preferentemente células de melanoma, células de un cáncer infantil, células de un tumor endócrino, células de un tumor carcinoide, células de timoma, células de cáncer de tiroides, células de un tumor de célula de isleta, células de un tumor de célula adrenal, células de un tumor neuroendócrino y células de un cáncer de un primario desconocido (cáncer de origen primario desconocido). La información detallada en tales cánceres puede encontrarse en la bibliografía relevante, tal como "Cancer Medicine", JF Holland, E Frei (editores), McGraw-Hill Professional, 8a edición (2010) y referencias citadas en la misma.

En una realización, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 solamente se encuentra en glóbulos o células precursoras de glóbulos, preferentemente en solamente un tipo de glóbulos.

30 En una realización, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 solamente se encuentra en células dirigidas, en particular, cancerosas, y no (o solamente a un grado insignificante) en células que no son células dirigidas, en particular, que no son cancerosas. En una realización preferida, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 es específica para células cancerosas de un cierto tipo de cáncer.

35 En una realización, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 distingue una cierta clase de células, preferentemente un cierto tipo de células de cáncer, de cualquier otra célula.

"Cierta tipo de cáncer" en este contexto puede significar tipo de cáncer caracterizado por el mismo órgano en el cual se forma el cáncer o, preferido, tipo de cáncer caracterizado por el mismo par de antígenos (aberrante) A1 y A2.

40 En una realización, la combinación de antígeno A1 y antígeno A2 se encuentra en células progenitoras/precursoras que son células progenitoras/precursoras de un tumor y no en células progenitoras/precursoras que no son células progenitoras/precursoras de un tumor.

45 En una realización, dicho antígeno A1 es un antígeno que es específico para el estado maligno de una célula y dicho antígeno A2 es un antígeno que es específico para el tipo celular o linaje celular de dicha célula.

En una realización,

- 50 a) antígeno A1 es EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial) y antígeno A2 es CD10 (grupo de diferenciación 10), HER2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico de humano), VEGF-R (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico; también llamado HER1 (receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico de humano) o ErbB1) o MDR (proteína con resistencia a múltiples fármacos), o  
 55 b) antígeno A1 es MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma) y antígeno A2 es melanoferrina o EpCAM, o  
 c) antígeno A1 es CA125 (antígeno de cáncer 125/antígeno de carbohidrato 125) y antígeno A2 es CD227 (PEM (mucina epitelial polimórfica) o MUC1 (mucina-1)), o  
 d) antígeno A1 es CD56 y antígeno A2 es CD140b (PDGFRβ (receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaqueta)) o gangliósido GD3, o  
 60 e) antígeno A1 es EGFR y antígeno 2 es HER2, o  
 f) antígeno A1 es PSMA (antígeno de membrana específico de próstata) y antígeno 2 es HER2, o  
 g) antígeno 1 es Sialyl Lewis y antígeno 2 es EGFR, o  
 h) antígeno 1 es CD44 y antígeno 2 es ESA (antígeno de superficie epitelial) (CD326, EpCAM), CD24, CD133, MDR (proteína con resistencia a múltiples fármacos) o CD117, o  
 65 i) antígeno 1 es CD34 y antígeno 2 es CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR (DR de antígeno de leucocito humano), CD13, CD117, CD33 o CD15, o

- j) antígeno 1 es CD33 y antígeno 2 es CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR (DR de antígeno de leucocito humano), CD13, CD117 o CD15, o  
 k) antígeno 1 es MUC1 y antígeno 2 es CD10, CEA o CD57, o  
 l) antígeno 1 es CD38 y antígeno 2 es CD138, o  
 5 m) antígeno 1 es CD24 y antígeno 2 es CD29 o CD49f, o  
 n) antígeno 1 es anhidrasa carbónica IX y antígeno 2 es acuaporina, preferentemente acuaporina-2.

En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 se selecciona del grupo que consiste en HLA-A (complejo mayor de histocompatibilidad HLA-A, clase I, A [Homo sapiens]; ID de Gen: 3105 actualizada el 13 de Enero de 2013; DAQB-90C11.16-002; Cromosoma: 6; NC\_000006.11 (29910247..29913661); para HLA-A2: 1. ARNm = LOCUS NM\_001242758 = Versión NM\_001242758.1 GI:337752169 = GenBank: AY191309.1 PRI 13 DE ENERO DE 2013; 2. Proteína = P79495 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Mayo de 1997. Versión 1.; para HLA-Cw6: ARNm = LOCUS HUMMHCCW6A = GenBank: VERSIÓN M28160.1 GI:531197PRI (18-AGOSTO-1994); Proteína = Q29963 [UniParc]. Modificada por última vez el 22 de Agosto de 2003. Versión 2.); EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial EPCAM [Homo sapiens]; también conocida como ESA; KSA; M4S1; MK-1; DIAR5; EGP-2; EGP40; KS1/4; MIC18; TROP1; EGP314; HNPCC8; TACSTD1.; ID de Gen: 4072, actualizada el 6 de Enero de 2013; ARNm = VERSIÓN NM\_002354.2 GI:218505669PRI 06 DE ENERO DE 2013; Proteína = P16422 [UniParc]. modificada por última vez el 13 de Noviembre de 2007. Versión 2.); CD45 (fosfatasa de tirosina proteínica PTPRC, tipo de receptor, C [Homo sapiens]; también conocido como LCA; LY5; B220; CD45; L-CA; T200; CD45R; GP180; ID de Gen: 5788, actualizada el 13 de Enero de 2013; ARNm = VERSIÓN NM\_002838.4 GI:392307006 PRI 13 DE ENERO DE 2013; Proteína = P08575-1 = Isoforma 1, Modificada por última vez el 19 de Julio de 2003. Versión 2.; Proteína = P08575-2 = Isoforma 2); Her2 (ERBB2 v-erb-b2 homólogo 2 de oncogén viral de leucemia eritroblástica, homólogo de oncogén (aviar) derivado de neuro/glioblastoma [Homo sapiens]; también conocido como NEU; NGL; HER2; TKR1; CD340; HER-2; MLN 19; HER-2/neu; ID de gen: 2064, actualizada el 13 de Enero de 2013; variante 1 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_004448.2 GI:54792095, PRI 06 DE ENERO DE 2013; variante 2 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_001005862.1 GI:54792097, PRI 06 DE ENERO DE 2013; Proteína = P04626-1 = Isoforma 1, Modificada por última vez el 13 de Agosto de 1987. Versión 1.; Proteína = P04626-2= Isoforma 2; Proteína = P04626-3= Isoforma 3; Proteína = P04626-4= Isoforma 4); EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR [Homo sapiens]; también conocido como ERBB; HER1; mENA; ERBB1; PIG61; ID de Gen: 1956, actualizada el 13 de Enero de 2013; variante 1 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_005228.3 GI:41327737, PRI 13 DE ENERO DE 2013; variante 2 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_201282.1 GI:41327731, PRI 13 DE ENERO DE 2013; variante 3 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_201283.1 GI:41327733, PRI 13 DE ENERO DE 2013; variante 4 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_201284.1 GI:41327735, PRI 13 DE ENERO DE 2013; Proteína = P00533-1 = Isoforma 1, Modificada por última vez el 1 de Noviembre de 1997. Versión 2.; Proteína = P00533-2 = Isoforma 2; Proteína = P00533-3 = Isoforma 3; Proteína = P00533-4 = Isoforma 4); CD138 (sindecan 1SDC1 [Homo sapiens]; ID de Gen: 6382, actualizada el 6 de Enero de 2013; variante 1 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_001006946.1 GI:55749479, PRI 06 DE ENERO DE 2013; variante 2 de transcripción de ARNm = VERSIÓN NM\_002997.4 GI:55925657, PRI 06 DE ENERO DE 2013; Proteína = P18827 [UniParc]. Modificada por última vez el 5 de Mayo de 2009. Versión 3.); CEA (molécula 5 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario CEACAM5 [Homo sapiens]; también conocido como CEA; CD66e; ID de Gen: 1048, actualizada el 13 de Enero de 2013; ARNm = VERSIÓN NM\_004363.2 GI:98986444, PRI 13 DE ENERO DE 2013; P06731, Modificada por última vez el 11 de Enero de 2011. Versión 3.); y CD19 (molécula CD19 [Homo sapiens]; también conocido como B4; CVID3; ID de Gen: 930, actualizada el 5 de Enero de 2013; transcripción 1 de ARNm = VERSIÓN NM\_001178098.1 GI:296010920, PRI 06 DE ENERO DE 2013; transcripción 2 de ARNm = VERSIÓN NM\_001770.5 GI:296010919, PRI 06 DE ENERO DE 2013; Proteína = P15391 [UniParc]. Modificada por última vez el 13 de Noviembre de 2007. Versión 6).

En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 es un antígeno MHC, preferentemente una variante alélica de cualquiera de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DR, o HLA-DM, más preferentemente una variante alélica de una molécula MHC de clase I, más preferentemente una variante alélica seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw6, y HLA-Cw7.

En una realización, dicho antígeno A1 es HLA-A2.

En una realización, dicho antígeno A1 y/o dicho antígeno A2 se selecciona del grupo que consiste en CD45, acuaporina, preferentemente acuaporina-2, miembro 1 del receptor depurador clase B (SCARB1), CD34, CD33, CD138, CD15, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD20, CD23, CD31, CD43, CD56, CD57, CD68, CD79a, CD146, sinaptofisina, CD56, CD57, receptor de acetilcolina nicotínico, quinasa específica muscular (MUSK), canal de calcio dependiente de voltaje (tipo P/Q), canal de potasio dependiente de voltaje (VGKC), receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor TSH (hormona estimulante de tiroides), amfifisina, HepPar-1, gangliósido GQ1B, gangliósido GD3, gangliósido GM1 y glicoforina-A.

En una realización preferida, dicho antígeno A1 es un antígeno MHC y dicho antígeno A2 es un antígeno que es específico para un cierto tipo celular o linaje celular.

En una realización, dicho dominio funcional F es un módulo de inmunoglobulina, preferentemente un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo más preferentemente un Fv (fragmento variante) de un anticuerpo. Se desvela en el presente documento también que el dominio funcional F es una molécula fluorescente, preferentemente una molécula de complementación de fluorescencia bimolecular, más preferentemente GFP o una variante GFP, o una molécula capaz de mediar bioluminiscencia, preferentemente una molécula de luciferasa, más preferentemente luciferasa de *Gaussia*.

En una realización, dicho dominio funcional F es un Fv (fragmento variante) de un anticuerpo.

En una realización, dicho dominio funcional F específicamente se une o es capaz de unirse específicamente a un antígeno. En un aspecto específico, dicho antígeno puede ser un antígeno que está presente en células del sistema inmune humano. En una realización preferida, dicha unión activa dichas células del sistema inmune humano.

En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que emplea célula T, preferentemente un dominio que emplea célula T uniéndose específicamente a CD2, CD3, CD5, receptor de célula T o CD28, más preferentemente un dominio que emplea célula T uniéndose específicamente a CD3 $\epsilon$ , un dominio que emplea célula NK (célula asesina natural), preferentemente un dominio que emplea célula NK uniéndose específicamente a CD1a, CD16a o CD56, un dominio que emplea células de macrófago, preferentemente un dominio que emplea células de macrófago uniéndose específicamente a CD16a, CD32a, CD32b, CD89 o CD64, un dominio que emplea monocito, preferentemente un dominio que emplea monocito uniéndose específicamente a CD32a, CD32b, CD64 o CD89, un dominio que emplea granulocito, preferentemente un dominio que emplea granulocito uniéndose específicamente a CD16b, CD32a, CD32b, CD64, o CD89, un dominio que emplea granulocitos de neutrófilo, preferentemente un dominio que emplea granulocitos de neutrófilo que se une específicamente a CD89 (Fc $\alpha$ RI), o un dominio que emplea macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados, preferentemente un dominio que emplea macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados que se une específicamente a CD64 (Fc $\gamma$ RI).

En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a un antígeno unido a un compuesto terapéutico o de diagnóstico.

En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula portadora o una etiqueta de afinidad. Preferentemente, dicha molécula portadora está unida a un compuesto terapéutico o de diagnóstico. Preferentemente, dicha etiqueta de afinidad está unida a un compuesto terapéutico o de diagnóstico.

Preferentemente, dicha etiqueta de afinidad se selecciona del grupo que consiste en una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST), una etiqueta de hemaglutinina (HA), una etiqueta de polihistidina (His), una etiqueta de digoxigenina (DIG) y una etiqueta de proteína de unión de maltosa (MBP).

Preferentemente, dicha molécula portadora es un péptido o una molécula de carbohidrato. En una realización preferida, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula portadora, preferentemente una molécula portadora enlazada a un compuesto terapéutico o de diagnóstico, en el que dicha molécula portadora se selecciona del grupo que consiste en gelatina, inulina, dextrano y almidón de hidroxi-etilo.

En una realización, dicho compuesto terapéutico es un compuesto radiactivo, preferentemente un compuesto radiactivo que comprende  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{10}\text{B}$ , o  $^{213}\text{Bi}$ . En una realización, dicho compuesto terapéutico es una toxina. Preferentemente, dicha toxina se selecciona del grupo que consiste en factor de edema *B. anthracis*, factor letal *B. anthracis*, toxina iota *C. perfringens*, toxina C2 *C. botulinum*, ADP-ribosiltransferasa *C. difficile*, fragmento A de toxina de difteria *C. diphtheriae*, toxina shiga (subunidad A) *Burgholderia* sp, toxina pfoA perfringolisina O *Clostridium perfringens* str. 13, cadena de Ricina A, bouganina RIP de planta, ribonucleasa RNASE3 de Humano (familia RNasa A, 3) y factor letal del ántrax endopeptidasa. Un ejemplo no limitante adicional de una toxina de acuerdo con esta invención es una toxina siendo o que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 160 a 168.

En una realización, dicho compuesto de diagnóstico es un compuesto radiactivo, preferentemente un compuesto radiactivo que comprende  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  o  $^{201}\text{Tl}$ . En una realización, dicho compuesto de diagnóstico es un compuesto fluorescente, preferentemente GFP, una variante GFP, o un compuesto de molécula pequeña fluorescente tal como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (fícoeritrina), un tinte alexa flúor (tal como AlexaFluor488 o tintes relacionados) o un tinte de cianina (tales como Cy3 (Indocarbocianina) o Cy5 (Indodicarbocianina) o tintes relacionados). En una realización, dicho compuesto de diagnóstico es una molécula capaz de mediar bioluminiscencia, preferentemente una molécula de luciferasa, más preferentemente luciferasa de *Gaussia*.

En el contexto de la invención, dicho fragmento F1 comprende un dominio V<sub>L</sub> de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio V<sub>H</sub> del mismo anticuerpo, en el que, preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3, más preferentemente un anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$ , o un anticuerpo anti-His o anti-DIG o dicho fragmento F1 comprende un dominio V<sub>H</sub> de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un dominio V<sub>L</sub> del mismo anticuerpo, en el que, preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3, más preferentemente un anticuerpo anti-

CD3ε, o un anticuerpo anti-His o anti-DIG.

Se desvela en el presente documento que los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> como se comprenden en el fragmento F1 y F2, respectivamente, o en el fragmento F2 y F1, respectivamente también pueden ser de dos diferentes anticuerpos, ya sea específicos para el mismo Antígeno (y para el mismo o un diferente epítipo) o para diferente Antígeno. Es decir, por ejemplo, contemplado para emplearse donde nuevas especificaciones están por crearse (por ejemplo en planteamientos de despliegue de fago).

En otra realización, el módulo de inmunoglobulina comprendido en el dominio F comprende un dominio V seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 18-20 (CDR 1-3) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 15-17 (CDR 1-3);
- (ii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 24-26 (CDR 1-3) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 21-23 (CDR 1-3);
- (iii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 30-32 (CDR 1-3) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 27-29 (CDR 1-3);
- (iv) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 36 y 37 (CDR 1 y 3) y DTS (CDR 2) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 33-35 (CDR 1-3);
- (v) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 41 y 42 (CDR 1 y 3) y YTN (CDR 2) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 38-40 (CDR1-3); y
- (vi) un dominio V de un anticuerpo anti-His que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 46 y 47 (CDR 1 y 3) y KVS (CDR 2) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 43-45 (CDR 1-3);
- (vii) un dominio V de un anticuerpo anti-DIG que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende SEQ ID NO: 50 y 131 (CDR 1 y 3) y YSS (CDR 2) y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende SEQ ID NO: 48 y 49 (CDR 1 y 2) y A (CDR 3).

En otra realización preferida, el módulo de inmunoglobulina comprendido en el dominio F comprende un dominio V seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 2 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 1;
- (ii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 4 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 3;
- (iii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 6 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 5;
- (iv) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 8 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 7;
- (v) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 10 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 9; y
- (vi) un dominio V de un anticuerpo anti-His que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 12 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 11;
- (vii) un dominio V de un anticuerpo anti-DIG que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 14 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 30.

En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula de toxina, preferentemente una molécula de toxina que por sí misma no es capaz de penetrar a través de la membrana celular de una célula de humano y que, preferentemente, se interioriza en una célula de humano al asociar con la membrana celular de dicha célula, en el que, preferentemente, dicha asociación con la membrana celular de dicha célula se media al unirse específicamente a un heterodímero formado de dos moléculas, preferentemente dos moléculas asociadas con dicha membrana celular, en el que, preferentemente, dichas dos moléculas son los polipéptidos P1 y P2 como se describe en la presente. En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente al componente A (componente activo) de una toxina bacteriana de dos componentes A-B. En una realización dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una toxina seleccionada del grupo que consiste en factor de edema *B. anthracis*, factor letal *B. anthracis*, toxina iota *C. perfringens*, toxina C2 *C. botulinum*, ADP-ribosiltransferasa *C. difficile*, fragmento A de toxina de difteria *C. diphtheriae*, toxina shiga (subunidad A) *Burgholderia* sp, toxina pfoA perfringolisina O *Clostridium perfringens* str. 13, cadena de Ricina A, bouganina RIP de planta, ribonucleasa RNASE3 de Humano (familia RNase A, 3) y factor letal del ántrax endopeptidasa. Un ejemplo no limitante adicional de una toxina de acuerdo con esta invención es una toxina siendo o que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 160 a 168.

En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula fluorescente, preferentemente una molécula fluorescente que por sí misma no es capaz de penetrar a través de la membrana celular de una célula de humano. Preferentemente, dicha molécula fluorescente es GFP o una variante GFP o una molécula que es o comprende un compuesto de molécula pequeña fluorescente tal como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), un tinte alexa flúor (tal como AlexaFluor488 o tintes relacionados) o

un tinte de cianina (tal como Cy3 (Indocarbocianina) o Cy5 (Indocarbocianina) o tintes relacionados).

En un aspecto, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a una molécula capaz de mediar bioluminiscencia, preferentemente a una molécula de luciferasa, más preferentemente una luciferasa de *Gaussia*.

En una realización, dicho dominio funcional F es una molécula fluorescente, preferentemente una molécula de complementación de fluorescencia bimolecular, más preferentemente GFP o una variante GFP, tal como YFP, CFP, Venus, o Cerulean.

Los ejemplos de polipéptidos particulares P1 o P2 comprendidos en el conjunto de polipéptidos de acuerdo con esta invención son polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 114-129 y 197.

En general, la presente invención se refiere al tratamiento o eliminación de cualquier población celular indeseada y el tratamiento o prevención de cualquier trastorno o enfermedad que acompaña a esta población celular indeseada. Para este propósito, está por utilizarse el conjunto de polipéptidos de esta invención.

En una realización, dicho conjunto de polipéptidos es un conjunto de polipéptidos para utilizarse en el tratamiento de un paciente quien padece de un tumor o cáncer o para uso de diagnóstico en un paciente quien padece de un tumor o cáncer, preferentemente para utilizarse en el tratamiento de un paciente quien padece de un tumor o cáncer y que experimenta trasplante alogénico de célula o tejido o significa que experimenta tal trasplante, o para uso de diagnóstico en un paciente quien padece de un tumor o cáncer y que experimenta o significa que experimenta trasplante alogénico de célula o tejido, en el que, preferentemente, dicho conjunto de polipéptidos se administra a dicho paciente.

Ejemplos de tumores a tratarse o diagnosticarse son aquellos para los cuales el tumor o células de cáncer se describen arriba en el presente documento con respecto a los antígenos A1 y/o A2.

En una realización, dicho tratamiento incluye la eliminación de tejido/células receptoras de un cierto tipo de célula, preferentemente un tipo celular canceroso, o células precursoras receptoras que dan origen a un cierto tipo de célula, preferentemente a un tipo celular canceroso, opcionalmente después o en paralelo al trasplante al receptor de tejidos/células donantes de dicho mismo tipo celular o células precursoras del donante que dan origen a dicho mismo tipo de célula.

En una realización, el conjunto de polipéptidos de la invención es para utilizarse en un escenario de trasplante alogénico para neoplasias hematopoyéticas, por ejemplo, con antígenos HLA incompatibles, en particular para uso en explotar terapéuticamente esta situación de incompatibilidad. En esta situación ejemplificativa, la información dual del haplotipo HLA receptor (HLA<sub>paciente</sub>) y origen de linaje hematopoyético (CD45) se despliega exclusivamente en blastocitos leucémicos y otras células hematopoyéticas del paciente. Todas otras células de origen receptor expresan el haplotipo receptor pero no el antígeno de linaje hematopoyético CD45 (por ejemplo, células no hematopoyéticas receptoras son positivas para HLA-A2 pero negativas para CD45). Del mismo modo, todas las células hematopoyéticas donantes expresan moléculas de haplotipo HLA donantes que significan que son positivas para CD45 pero negativas para HLA-A2 en la situación de un trasplante incompatible donde el paciente pero no el donante es positivo para HLA-A2. Consecuentemente, la presente invención también se refiere a construcciones de anticuerpo de cadena sencilla de complementación y bimolecular dirigidas contra HLA-A2, en casos donde el paciente pero no el donante es positivo para HLA-A2, y una segunda construcción específica para el marcador de linaje hematopoyético CD45 para dirigir específicamente todas las células hematopoyéticas del paciente incluyendo todos los neoplasmas hematológicos. Por consiguiente, el primer polipéptido P1 puede comprender una construcción de anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla dirigida contra el HLA del paciente (porción dirigida T1) fusionada al fragmento V<sub>L</sub> de F1 antiCD3 (por ejemplo, fragmento F1). El segundo polipéptido P2 puede comprender una construcción de fragmento variable de cadena sencilla específica para un marcador de linaje hematopoyético (por ejemplo, CD45; porción dirigida T2), fusionada al fragmento de división V<sub>H</sub> de F2 anti CD3-Fv (fragmento F2).

En una realización, dicha eliminación incluye la destrucción de dicho tejido/células receptoras o dichas células precursoras receptoras por células del sistema inmune, por una toxina o por un compuesto radiactivo.

En una realización, dicho conjunto de polipéptidos es un conjunto de polipéptidos para uso de diagnóstico en un paciente que se somete a trasplante alogénico de célula o tejido, en el que, preferentemente, dicho paciente es un paciente que padece un tumor.

En una realización, dicho uso de diagnóstico incluye la detección específica de células receptoras de un cierto tipo celular o linaje celular entre células receptoras de diferente tipo celular o linaje celular y células donantes del mismo o diferente tipo o linaje celular.

En una realización, dicho uso de diagnóstico incluye la detección específica de células receptoras que son células malignas entre células receptoras que no son malignas y entre células donantes. En una realización, dicho conjunto de polipéptidos se administra a un paciente.

5 Preferentemente, dicho paciente es un mamífero, más preferentemente un ser humano.

En una realización, dicha administración ocurre por administración en bolo o por administración continua.

10 En una realización, los polipéptidos P1 y P2 de dicho conjunto de polipéptidos se administran en paralelo. En otra realización, los polipéptidos P1 y P2 de dicho conjunto de polipéptidos se administran secuencialmente.

En una realización, uno de los polipéptidos P1 o P2 de dicho conjunto de polipéptidos se administra por administración en bolo, mientras que el otro se administra por administración continua.

15 En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2, preferentemente en el intervalo de desde 5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2, más preferentemente en el intervalo de desde 10  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 80  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2.

En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 0.05  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2.

25 En una realización, la cantidad de polipéptido P1 administrada es diferente de la cantidad de polipéptido P2 administrada.

En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 300  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 300  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 400  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 400  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2. En una realización, la cantidad de polipéptido administrada está en el intervalo de desde 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día a 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1 o para el polipéptido P2 o para cada uno de los polipéptidos P1 y P2.

Los artículos de referencia adicionales para derivar las cantidades de los polipéptidos P1 y P2 a administrarse, también pueden obtenerse al consultar estudios llevados a cabo con construcciones de anticuerpos biespecíficas (por ejemplo, Bargou R et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science. 2008; 321(5891):974-7; y Topp MS et al. La terapia dirigida con el anticuerpo que emplea célula T, blinatumomab, de enfermedad residual mínima resistente a quimioterapia en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linaje B, resulta en alta tasa de respuesta y supervivencia libre de leucemia prolongada. J Clin Oncol. 2011, 29:2493-8).

50 En una realización, dicha administración ocurre continuamente durante al menos 12 horas o durante al menos 1 día o durante al menos 2 días o durante al menos 3 días o durante al menos 4 días o durante al menos 5 días o durante al menos 6 días o durante al menos 7 días o durante al menos 8 días o durante al menos 9 días o durante al menos 10 días o durante al menos 11 días o durante al menos 12 días o durante al menos 13 días o durante al menos 14 días o durante al menos 15 días o durante al menos 16 días o durante al menos 17 días o durante al menos 18 días o durante al menos 19 días o durante al menos 20 días o durante al menos 21 días o durante al menos 22 días o durante al menos 23 días o durante al menos 24 días o durante al menos 25 días o durante al menos 26 días o durante al menos 27 días o durante al menos 28 días o durante al menos 29 días o durante al menos 30 días o durante al menos 5 semanas o durante al menos 6 semanas.

60 En una realización, dicha administración de dicho conjunto de polipéptidos o de uno de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos ocurre intravenosamente, preferentemente por inyección intravenosa.

65 En una realización, dicha administración de dicho conjunto de polipéptidos o de uno de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos ocurre subcutáneamente, preferentemente por inyección subcutánea.



En una realización, dicho conjunto de polipéptidos se administra en combinación con uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en un fármaco inmunomodulador, y/o un esteroide, preferentemente prednisolona o prednisona.

5 En una realización, dicho conjunto de polipéptidos se administra en combinación con un compuesto radiactivo, preferentemente un compuesto radiactivo unido a un antígeno, una molécula portadora o una etiqueta de afinidad, en el que dicho compuesto radiactivo, dicho antígeno, dicha molécula portadora o dicha etiqueta de afinidad se une específicamente por dicho dominio funcional F.

10 En una realización, dicho conjunto de polipéptidos se administra en combinación con una toxina, preferentemente una toxina enlazada a un antígeno, una molécula portadora o una etiqueta de afinidad, en el que dicha toxina, dicho antígeno, dicha molécula portadora o dicha etiqueta de afinidad se une específicamente por dicho dominio funcional F.

15 En una realización, dicho conjunto de polipéptidos se administra en combinación con una molécula fluorescente, preferentemente una molécula fluorescente enlazada a un antígeno, una molécula portadora o una etiqueta de afinidad, en el que dicho fluoróforo, dicho antígeno, dicha molécula portadora o dicha etiqueta de afinidad se une específicamente por dicho dominio funcional F.

20 En una realización, dicho dominio funcional F es un dominio que se une específicamente a un antígeno que no se reconoce como extraño por el sistema inmune de dicho paciente a quien se administra dicho conjunto de polipéptidos.

25 En una realización dos conjuntos de polipéptidos como se describe arriba (un primer conjunto de polipéptidos y un segundo conjunto de polipéptidos) se administran simultánea o secuencialmente. En una realización preferida, dicho primer conjunto de polipéptidos tiene fragmentos F1 y F2 diferentes a dicho segundo conjunto de polipéptidos. En una realización preferida, dicho primer conjunto de polipéptidos tiene los mismos fragmentos F1 y F2 que dicho segundo conjunto de polipéptidos. En una realización preferida, las porciones dirigidas T1 y T2 de dicho primer conjunto de polipéptidos se unen a los mismos antígenos que las porciones dirigidas T1 y T2, respectivamente, de dicho segundo conjunto de polipéptidos. En una realización preferida, las porciones dirigidas T1 y T2 de dicho primer conjunto de polipéptidos se unen a antígenos diferentes que las porciones dirigidas T1 y T2 de dicho segundo conjunto de polipéptidos.

35 En una realización, dicho paciente se ha sometido a tratamiento de cáncer antes del tratamiento con dicho conjunto de polipéptidos, dicho tratamiento de cáncer preferentemente siendo quimioterapia, terapia de radiación o retiro operativo del tumor, o se somete a tratamiento de cáncer paralelo al tratamiento con dicho conjunto de polipéptidos, dicho tratamiento de cáncer preferentemente siendo quimioterapia, terapia de radiación o retiro operativo del tumor.

40 En una realización, dicho conjunto de polipéptidos o uno de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos se ha producido por medios de un sistema de expresión procarriota o eucariota o por síntesis de péptido *de novo*.

En una realización, dicho conjunto de polipéptidos o uno de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos se genera dentro de dicho paciente por expresión de proteína de un ácido nucleico introducido en dicho paciente.

45 Muchos pacientes padecen enfermedades alérgicas o auto-inmunes. En muchos de estos casos, una población de célula B clonal produce un anticuerpo errante que reacciona con antígenos expresados por los tejidos de los pacientes o complejo con un alérgeno, causando reacciones anafilácticas. En ambos casos, es deseable eliminar específicamente el clon de célula B errante.

50 Para este fin, uno puede modificar el sistema combinatorio en una manera que un brazo (P1 o P2, en particular T1 o T2) reconoce un antígeno asociado a célula B (por ejemplo, CD19, CD20, CD38 o CD138) y el otro brazo (P2 o P1, en particular T2 o T1, respectivamente) es el alérgeno o el sustrato unido por el anticuerpo que causa la enfermedad autoinmune. Cuando estas dos construcciones se unen a una célula B que es positiva para CD19 (CD20, CD38 o CD138) y simultáneamente despliega el anticuerpo clonotípico en la superficie, VH y VL anti-CD3 unidas pueden interactuar y reconstituir el sitio de unión CD3 exactamente en la célula B. Este ensamblaje específico de antígeno o específico de alérgeno resultará por último en la eliminación clonal de las células B marcadas como diana.

60 Por consiguiente, de acuerdo con esta invención, cualquiera de dichos antígenos A1 y A2 también puede ser un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B, en particular una célula B que causa un trastorno autoinmune.

En este contexto, por ejemplo, uno de dichos antígenos A1 y A2 puede ser CD19 y el otro puede ser un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B, en particular una célula B que causa un trastorno autoinmune.

65 De acuerdo con este aspecto de la invención, cualquiera de dicho resto diana T1 y T2 puede comprender un alérgeno o sustrato que se une al anticuerpo clonotípico en la superficie de la célula B y/o que, uniéndose al

anticuerpo clonotípico, es capaz de causar un trastorno autoinmune. Los ejemplos no limitantes de un alérgeno comprendido en cualquiera de dicho resto diana T1 y T2 son alérgenos pilosos, como, por ejemplo, alérgenos de pelo de perro, pelo de gato (por ejemplo, Fel d 1, Feld d1A, Feld d1B) o pelo de conejillo de Indias, o alérgenos de polen, como, por ejemplo, abedul, césped, alérgenos de polen. Los ejemplos adicionales no limitantes son alérgenos de ácaro (por ejemplo Tyr p 2, Der P1, Der f 2), alérgenos de gato (por ejemplo Fel d 1, Feld d1A, Feld d1B), alérgenos de cacahuete (por ejemplo Conglutina-7), alérgenos de hongo putrefacto (por ejemplo Alt a 1), alérgenos de perro (por ejemplo Can f 1), alérgenos de trigo celiaco (por ejemplo Alfa/beta-gliadina), alérgenos de cucaracha alemana (por ejemplo alérgeno variante Bla g 1.02), alérgenos de árbol de betula o polen (graves) (por ejemplo Cyn d 1, Pha a 1, Dac g 3, Phl p 2, Phl p 1, Profilin, Bet v 1-L, Bet v 1-A), alérgenos de manzana graves (por ejemplo Mal d 1), alérgenos de leche de vaca (por ejemplo alfa-lactalbúmina, alfa-S1-caseína), alérgenos de huevo de gallina (por ejemplo lisozima C, ovalbúmina) y alérgenos de caballo (por ejemplo laterina, Equ c 1), y lo similar. Un ejemplo preferido y no limitante adicional de un alérgeno comprendido en cualquiera de dicho resto diana T1 y T2 es el antígeno para anticuerpo U266 de estirpe de mieloma de humano IgE-ND. Un ejemplo preferido y no limitante adicional de un alérgeno comprendido en cualquiera de dicho resto diana T1 y T2 es un alérgeno siendo o que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 169 a 195.

También se desvela en el presente documento el conjunto de polipéptidos como se describe en la presente, y, en particular en el aspecto anterior, para utilizarse en el tratamiento o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en

- (i) un trastorno autoinmune; y
- (ii) un trastorno de hipersensibilidad.

Los ejemplos no limitantes de un trastorno autoinmune a tratarse o prevenirse de acuerdo con esta invención se seleccionan del grupo que consiste en

- (i) trastornos alérgicos;
- (ii) Esclerosis Múltiple;
- (iii) Psoriasis;
- (iv) Lupus Eritematoso Sistémico;
- (v) Síndrome de Sjögren;
- (vi) Artritis Reumatoide;
- (vii) Púrpura Trombocitopénica Idiopática;
- (viii) Diabetes;
- (xi) Vasculitis;
- (x) enfermedad de Crohn; y
- (xi) Amiloidosis.

Los ejemplos no limitantes de un trastorno de hipersensibilidad a tratarse o prevenirse de acuerdo con esta invención se seleccionan del grupo que consiste en alergias (reacción de hipersensibilidad tipo I de acuerdo con clasificación de Coombs y Gell), una reacción citotóxica dependiente de anticuerpo (reacción de hipersensibilidad tipo II), una enfermedad compleja inmune (reacción de hipersensibilidad tipo III), hipersensibilidad de tipo retrasado (reacción de hipersensibilidad tipo IV) y una enfermedad autoinmune mediada por receptor (reacción de hipersensibilidad tipo V).

En un aspecto preferido, dicho trastorno autoinmune o de hipersensibilidad viene con o se activa por trasplante de célula madre alogénico (es decir, cualquier trastorno de hipersensibilidad de tipo I a tipo V de acuerdo con la clasificación de Coombs y Gell).

Muchas células que se infectan por un patógeno (por ejemplo un virus, como, por ejemplo, VIH, EBV, CMV) expresan proteínas codificadas por patógeno en su superficie celular. Por consiguiente, de acuerdo con esta invención, cualquiera de dichos antígenos A1 y A2 también puede ser tal proteína codificada por patógeno, como, por ejemplo, una proteína de HIV, EBV o CMV en la superficie de una célula. En este contexto, también se desvela en el presente documento el conjunto de polipéptidos como se describe en el presente documento para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa, por ejemplo una enfermedad infecciosa vírica. Los ejemplos particulares de proteínas codificadas por patógeno pueden derivarse de <http://www.uniprot.org/uniprot/> y son HIV gp120 (Q78706); EBV LMP-2 (P13285); CMV gB (P06473); HBV HBS (Q9JG36); HCV E1 (C4B751); HCV E2 (Q6TRB1); serotipo 2 de adenovirus humano C HAdV-2 (P03276).

Los objetos de la presente invención también se resuelven por una molécula de ácido nucleico o un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifica el conjunto de polipéptidos o uno de los polipéptidos del conjunto de polipéptidos como se define en las realizaciones de arriba, en el que, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico o las moléculas de ácido nucleico de dicho conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende una señal de exportación que media la secreción del polipéptido o polipéptidos codificados por una célula bacteriana o eucariótica.

Un ejemplo no limitante de la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con

esta invención comprende una o más de las secuencias nucleótidas como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO: 135-150 y 196.

5 Los objetos de la presente invención también se resuelven por un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico como se define arriba o la secuencia de una de las moléculas de ácido nucleico del conjunto de moléculas de ácido nucleico como se define arriba.

10 Los objetos de la presente invención también se resuelven por una célula que comprende dicho ácido nucleico/conjunto de ácidos nucleicos o dicho vector.

15 Los objetos de la presente invención también se resuelven por una composición farmacéutica que comprende ya sea el conjunto de polipéptidos como se define arriba o la molécula de ácido nucleico/conjunto de moléculas de ácido nucleico como se define arriba o el vector como se define arriba, en el que, preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Los objetos de la presente invención también se resuelven por un kit que comprende el conjunto de polipéptidos como se define arriba y/o la molécula de ácido nucleico o el conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o el vector de acuerdo con la invención.

25 En una realización, los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos comprendido por dicho kit se contienen en un frasco único.

En una realización preferida, los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos comprendido por dicho kit se contienen en frascos separados.

30 En una realización, uno o más de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos comprendido por dicho kit se liofilizan.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de dicho conjunto de polipéptidos comprendido por dicho kit están en solución.

Se desvela también en el presente documento un método para tratamiento de un paciente quien padece

- 35 (i) un tumor o cáncer y/o quien se somete a trasplante de tejido o célula alogénico;  
 (ii) un trastorno autoinmune; o  
 (iii) un trastorno de hipersensibilidad.

Dicho método puede comprender las etapas de:

40 -obtener un conjunto de polipéptidos, dicho conjunto de polipéptidos que comprende un primer polipéptido P1 que comprende

- (i) un resto diana T1,  
 en el que dicho resto diana T1 se une específicamente a un antígeno A1, y  
 (ii) un fragmento F1 de un dominio funcional F,

45 en el que ni dicho fragmento F1 por sí mismo ni dicho polipéptido P1 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio F,

y

un segundo polipéptido P2 que comprende

- 50 (i) un resto diana T2,  
 en el que dicho resto diana T2 se une específicamente a un antígeno A2, dicho antígeno A2 siendo una molécula de superficie celular que es específica para un cierto tipo celular o linaje celular, y  
 (ii) un fragmento F2 de dicho dominio funcional F,

en el que ni dicho fragmento F2 por sí mismo ni dicho polipéptido P2 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio F,

55 en el que dicho antígeno A1 es diferente de dicho antígeno A2,  
 en el que dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no se asocian entre sí en la ausencia de un sustrato que tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie, más específicamente una célula que lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular, y

60 en el que, al dimerizarse dicho fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con dicho fragmento F2 de dicho polipéptido P2, el dímero resultante es funcional con respecto a la función de dicho dominio F,

-administrar dicho conjunto de polipéptidos a dicho paciente.

En tal método de tratamiento, dicho conjunto de polipéptidos es como se define en las realizaciones anteriores.

65 También se desvela en el presente documento un método para utilizar el conjunto de polipéptidos como se describe arriba para tratamiento de un paciente que se somete a trasplante de tejido o célula.

Los objetos de la presente invención también se resuelven por el uso de un conjunto de proteínas como se define en

las realizaciones de arriba para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece las enfermedades definidas y descritas arriba, un trastorno o, por ejemplo, un paciente que padece cáncer y/o que se somete a trasplante de célula o tejido.

5 Como se utiliza en la presente, el término “polipéptido” se refiere a una cadena molecular lineal de aminoácidos que contiene más de 30 aminoácidos. Opcionalmente, un polipéptido puede incluir uno o más enlaces de disulfuro o modificarse químicamente. Igualmente, opcionalmente un elemento no proteico (tal como un fluoróforo, aptámero de ARN, aptámero de ADN, o molécula pequeña) puede unirse a dicha cadena molecular lineal de aminoácidos. Tales polipéptidos pueden producirse por cualquier método conocido. El polipéptido, por ejemplo, puede generarse por  
10 expresión de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, o puede sintetizarse por métodos de síntesis de fase sólida, o producirse por conjugación o enlace de moléculas existentes, por ejemplo, por enlace químico.

El término “polipéptido P1” se utiliza para referirse a un polipéptido que comprende (i) un resto diana, en el que dicho resto se une específicamente a un antígeno, y (ii) un fragmento de un dominio funcional, en el que ni  
15 dicho fragmento por sí mismo ni dicho polipéptido P1 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio funcional. El término “polipéptido P2” se utiliza para referirse a un polipéptido que comprende (i) un resto diana, en el que dicho resto se une específicamente a un antígeno, y (ii) un fragmento de un dominio funcional, en el que ni dicho fragmento por sí mismo ni dicho polipéptido P2 por sí mismo es funcional con respecto a la función de dicho dominio funcional.

20 El término “dominio”, como se utiliza en la presente, se refiere a una cadena molecular lineal de aminoácidos que incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido entero o una porción de un polipéptido. Opcionalmente, un dominio puede incluir uno o más enlaces de disulfuro o modificarse químicamente. Igualmente, opcionalmente un dominio puede comprender un elemento no proteico (tal como un fluoróforo). En una realización, sin embargo, el término “dominio” no comprende compuestos que se modifican químicamente o comprenden elemento o elementos  
25 no proteicos.

Un “dominio funcional”, como se utiliza en la presente, es un dominio que es capaz de cumplir una cierta función, tal como unión específica a un cierto compañero de unión o antígeno, activación específica de un cierto receptor, mediación de efectos tóxicos, o fluorescencia en excitación con luz de una longitud de onda apropiada.  
30

La expresión “dominio funcional F” significa preferentemente incluir también compuestos que no son proteicos. En una realización, sin embargo, se refiere a un compuesto proteico o una parte funcional del mismo.

35 La expresión “un fragmento de un dominio”, como se utiliza en la presente, se refiere a una cadena molecular lineal de aminoácidos que corresponde a una parte de un dominio, pero no el dominio completo. Opcionalmente, un fragmento de un dominio puede incluir uno o más enlaces de disulfuro o modificarse químicamente. Igualmente, opcionalmente un dominio puede comprender un elemento no proteico o parte de tal un elemento no proteico.

40 La expresión “fragmento F1” se utiliza para referirse a un fragmento de un dominio funcional. El término “fragmento F2” se utiliza para referirse a un fragmento de un dominio funcional.

Las abreviaturas por pares P1, P2; T1, T2; F1, F2; A1, A2; y I1, I2, como se utiliza en la presente, significan designar diferentes polipéptidos, porciones dirigidas, fragmentos, antígenos, y módulos de inmunoglobulina, respectivamente.  
45 Son sinónimos de un primer polipéptido, segundo polipéptido; primera porción dirigida, segunda porción dirigida; primer fragmento, segundo fragmento; primer antígeno, segundo antígeno; y primer módulo de inmunoglobulina, segundo módulo de inmunoglobulina, respectivamente.

El término “resto”, como se utiliza en la presente, se refiere a una cadena molecular lineal de aminoácidos que incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido entero o una porción de un polipéptido. Opcionalmente, una porción puede incluir uno o más enlaces de disulfuro o modificarse químicamente. Igualmente, opcionalmente una porción puede comprender un elemento no proteico (tal como un oligonucleótido). En una realización, sin embargo, el término “porción” no comprende compuestos que se modifican químicamente o comprende elemento o elementos  
50 no proteicos.

55 La expresión “resto diana T1” se utiliza para referirse a un resto que se une específicamente a un antígeno, por ejemplo antígeno A1. El término “porción dirigida T2” se utiliza para referirse a una porción que se une específicamente a un antígeno, por ejemplo antígeno A2.

60 Como se utiliza en la presente, un “conector” es una secuencia de aminoácidos dentro de un polipéptido que conecta dos partes de dicho polipéptido o dos dominios comprendidos por dicho polipéptido.

El término “molécula de ácido nucleico”, como se utiliza por la presente invención, define una cadena molecular lineal que consiste en más de 30 nucleótidos. El término incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN.  
65

El término “construcción”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende

una o más secuencias nucleótidas recombinantes. El término también incluye polipéptidos que se expresan de una secuencia de nucleótidos recombinante o que se hacen artificialmente o moléculas recombinantes que comprenden dos o más secuencias de aminoácidos que no se encuentran de manera natural dentro de la misma proteína.

5 El término “se une específicamente a” o “específicamente se une”, como se utiliza por la presente invención en el contexto de una molécula o dominio que se une específicamente a un compañero de interacción o antígeno o que específicamente une un compañero de interacción o antígeno, significa que una molécula o dominio se une a dicho compañero de interacción o antígeno, preferentemente por enlace no covalente, o es capaz de unir dicho compañero de interacción o antígeno, preferentemente por enlace no covalente, y no o esencialmente no reacciona  
10 de manera cruzada con cualquier otro compañero de interacción o antígeno con una estructura similar a aquella del compañero de interacción o antígeno.

En el contexto de un resto diana (tal como porción dirigida T1 o T2) uniéndose específicamente a un antígeno (tal como antígeno A1 o A2), el término “se une específicamente a” significa referirse a una situación donde ya sea dicho  
15 resto diana es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno, o donde en efecto se une al mismo.

En el contexto de un dominio que emplea célula T, un dominio que emplea célula NK, dominio que emplea células macrófago, un dominio que emplea monocito, un dominio que emplea granulocito, un dominio que emplea granulocitos de neutrófilo, o un dominio que emplea macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados,  
20 el término “uniéndose específicamente a” un antígeno o molécula o “se une específicamente a” un antígeno o molécula significa referirse a una situación donde ya sea el dominio respectivo es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno o molécula, o donde se une específicamente al mismo.

En el contexto de un dominio funcional siendo un dominio que “se une específicamente a” un antígeno, una molécula, un compuesto, una molécula portadora o una etiqueta de afinidad, el término “se une específicamente a”  
25 significa referirse a una situación donde ya sea dicho dominio funcional es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno, molécula, compuesto, molécula portadora o etiqueta de afinidad, o donde se une específicamente al mismo.

En el contexto de una toxina, fluoróforo, antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad siendo “específicamente unida por” un dominio funcional, esto significa referirse a una situación donde ya sea dicho dominio funcional es capaz de unirse específicamente a dicha toxina, fluoróforo, antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad, o donde se une específicamente al mismo.

35 Como se usa en el presente documento, una molécula o antígeno es “específico para un cierto tipo celular o linaje celular” si se expresa por dicho tipo de célula/células de dicho linaje celular, pero no (o solamente a un grado insignificante) por otros tipos de células o células de otro linaje celular. En algunas realizaciones, una molécula o antígeno es “específico para un cierto tipo celular o linaje celular” si se expresa por dicho tipo de célula/células de dicho linaje celular, y no más de unos otros pocos tipos de células o células de otro linaje celular además dicho tipo de célula/células de dicho linaje celular expresan dicho antígeno también, mientras la mayoría de otros tipos de células o células de otro linaje celular además dicho tipo de célula/células de dicho linaje celular no expresan dicho antígeno (o solamente a un grado insignificante). El término “específico para un cierto tipo celular o linaje celular” también puede significar que dicha molécula o antígeno se expresa por dicho tipo de célula/células de dicho linaje celular a una tasa más alta o a una cantidad o proporción más alta que por otros tipos de células/células de otros linajes celulares, en el sentido que puede haber una expresión pequeña pero detectable de dicha molécula también en otros tipos de células/células de otros linajes celulares. El término “marcador”, como se utiliza en el presente documento en el contexto de un marcador para un cierto tipo celular o linaje celular, puede referirse a una molécula o antígeno que es específico para un tipo celular o células de un linaje celular, respectivamente, como se describe arriba.

50 Como se utiliza en la presente, el término “aptámero” se refiere a un compuesto pequeño compuesto de ácido oligonucleico (tal como ARN o ADN) o molécula peptídica o no peptídica que se une a una molécula diana específica con alta afinidad.

55 Como se utiliza en la presente, el término “molécula portadora” se refiere a una molécula o parte de una molécula que no se reconoce como extraña por el sistema inmune de un paciente a quien el conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención se administra o que no causa o solamente causa una reacción inmune débil por un paciente a quien se administra el conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención. Preferentemente, tal una “molécula portadora” uniéndose por o capaz de unirse por otra molécula, tal como un anticuerpo. En algunas realizaciones, una “molécula portadora” es una molécula o parte de una molécula que en ciertas realizaciones, la molécula portadora se une covalentemente o no covalentemente a una segunda molécula o parte de una segunda molécula, por ejemplo un fluoróforo o toxina.  
60

El término “MHC” se refiere al Complejo Mayor de Histocompatibilidad, que es un conjunto de genes que codifica un grupo de moléculas que comprenden moléculas de superficie celular que se requieren para presentación de antígeno a células T y que también son responsables de rechazos rápidos de injerto. En humanos, MHC incluye los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-HQ, y HLA-DR. En la presente solicitud, el término se utiliza para referirse a los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad así como a los productos genéticos codificados por estos genes. El término “HLA” se refiere a Antígenos Leucocitarios Humanos. Como se utiliza en la presente, “HLA” es la forma humana de “MHC”.

El término “variante alélica”, como se utiliza en la presente, denota cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo lugar cromosómico. Por ejemplo, HLA-A1, HLA-A2, y HLA-A3 son tres de las variantes alélicas de HLA-A. El término variante alélica también se utiliza en el presente documento para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

El término “antígeno”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula conocida por unirse específicamente por o capaz de unirse específicamente por un anticuerpo o la parte de unión a antígeno de un anticuerpo. En su significado más amplio, “antígeno A1” se refiere a un antígeno como se define arriba. En su significado más amplio “antígeno A2” se refiere a un antígeno como se define arriba. Las designaciones “antígeno A1” y “antígeno A2” se han elegido para permitir la distinción entre “antígeno A1” y “antígeno A2”. Un “antígeno MHC” es un antígeno que también es una molécula perteneciente al complejo de histocompatibilidad principal. Antígenos MHC incluyen antígenos MHC clase I (en humanos, los antígenos HLA-A, -B, y -C) y antígenos MHC clase II (en humanos, los antígenos HLA-DP, -DQ, y -DR). La frase que una célula “lleva un antígeno” o “lleva un antígeno en su superficie celular” significa referirse a una situación donde una célula expresa un antígeno que está presente en la superficie celular de dicha célula y accesible para un anticuerpo desde afuera de dicha célula. La frase que un sustrato “tiene un antígeno en su superficie” significa referirse a una situación donde dicho antígeno está presente en la superficie de dicho sustrato y accesible para un anticuerpo aplicado a dicho sustrato.

La expresión “un antígeno que es específico para el estado maligno de una célula”, como se utiliza en la presente, se refiere a un antígeno que lleva una célula maligna de un cierto tipo celular (tal como una célula de tumor de célula B maligna) en su superficie celular, pero que no lleva (o solamente a un grado insignificante) una célula del mismo tipo celular que no es maligna (tal como una célula B no maligna) en su superficie celular.

La expresión “un antígeno/molécula que es específica para un tipo celular maligno”, como se utiliza en la presente, se refiere a un antígeno/molécula que lleva una célula maligna de un cierto tipo celular (tal como célula de tumor de célula B maligna) en su superficie celular, pero que no lleva (o solamente a un grado insignificante) una célula del mismo tipo celular que no es maligna (tal como una célula B no maligna) o células de otros tipos de células (tales como células T o hepatocitos) en su superficie celular. En algunas realizaciones, el término “un antígeno/molécula que es específica para un tipo celular maligno” se refiere a un antígeno/molécula que lleva una célula maligna de un cierto tipo celular (tal como célula de tumor de célula B maligna) en su superficie celular, pero que no lleva (o solamente a un grado insignificante) una célula del mismo tipo celular que no es maligna (tal como una célula B no maligna) en su superficie celular, y que solamente lleva células de unos otros pocos tipos de células además de cierto tipo celular en su superficie celular, mientras no lleva (o solamente a un grado insignificante) las células de la mayoría de otros tipos de células. El término “un antígeno/molécula que es específica para un tipo celular maligno” también puede significar que dicho antígeno/molécula se expresa por dicha célula maligna de un cierto tipo celular a una tasa más alta o a una cantidad o proporción más alta que por una célula del mismo tipo celular que no es maligna, en el sentido que puede haber una expresión pequeña pero detectable de dicha molécula también en una célula del mismo tipo celular que no es maligna. El término “marcador”, como se utiliza en el presente documento en el contexto de un marcador para el estado maligno de una cierta célula o para un tipo celular maligno, puede referirse a una molécula o antígeno que es específico para el estado maligno de una cierta célula o para un tipo celular maligno, respectivamente, como se describe arriba.

La expresión “dominio de inmunoglobulina”, como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio que esencialmente consiste en una región globular de una cadena de anticuerpo. Dominios de inmunoglobulina se caracterizan en que retienen la característica de doblado de inmunoglobulina de moléculas de anticuerpo. Inmunoglobulinas, tales como IgG, IgE, o IgM, se componen de un número variable de cadenas pesadas y ligeras. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) y cada región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) contiene tres regiones hipervariables, también llamadas “regiones que determinan la capacidad de complementación” o “CDR”. Las CDR son principalmente responsables de la unión de la inmunoglobulina a un antígeno.

Los términos “ $V_H$ ” o “dominio  $V_H$ ” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo. Los términos “ $V_L$ ” o “dominio  $V_L$ ” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo.

La expresión “módulo de inmunoglobulina”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula, parte de una molécula o ensamble molecular que comprende uno o más, preferentemente dos o más, dominios de inmunoglobulina y que es capaz de unirse a un antígeno. Preferentemente, un “módulo de inmunoglobulina”

comprende una cadena molecular lineal de aminoácidos que incluye la secuencia de aminoácidos de uno o más, preferentemente dos o más, dominios de inmunoglobulina. Opcionalmente, un “módulo de inmunoglobulina” comprende uno o más, preferentemente dos o más, enlaces de disulfuro. Se incluyen en el término “módulo de inmunoglobulina” las moléculas o partes de una molécula que comprenden o consisten de un “fragmento variante de cadena sencilla” de un anticuerpo. También se incluyen en el término “módulo de inmunoglobulina” moléculas o partes de una molécula que comprenden o consisten de un dominio  $V_{H/H}$  de un anticuerpo de llama, un anticuerpo de camello, o un anticuerpo de tiburón.

La expresión “módulo de inmunoglobulina I1” se utiliza para referirse a un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ . Preferentemente, dicho dominio  $V_L$  y dicho dominio  $V_H$  de dicho módulo de inmunoglobulina I1 se derivan del mismo anticuerpo. Preferentemente, dicho dominio  $V_L$  y dicho dominio  $V_H$  de dicho módulo de inmunoglobulina I1 forman un dímero. Preferentemente, dicho dímero es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Dicho antígeno puede ser, por ejemplo, el antígeno A1. En una realización, dicho “módulo de inmunoglobulina I1” comprende un “fragmento variante de cadena sencilla” de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, por ejemplo el antígeno A1.

El término “módulo de inmunoglobulina I2” se utiliza para referirse a un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ . Preferentemente, dicho dominio  $V_L$  y dicho dominio  $V_H$  de dicho módulo de inmunoglobulina I2 se derivan del mismo anticuerpo. Preferentemente, dicho dominio  $V_L$  y dicho dominio  $V_H$  de dicho módulo de inmunoglobulina I2 forman un dímero. Preferentemente, dicho dímero es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Dicho antígeno puede ser, por ejemplo, el antígeno A2. En una realización, dicho “módulo de inmunoglobulina I2” comprende un “fragmento variante de cadena sencilla” de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, por ejemplo el antígeno A2.

Dentro de una construcción de un módulo de inmunoglobulina que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , el dominio  $V_L$  puede posicionarse N- o C-terminalmente del dominio  $V_H$  correspondiente. La persona experta es capaz de determinar qué orden de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  es más adecuado para un dominio de fragmento variante de cadena sencilla específico.

Los términos “Fv” y “fragmento variante”, como se utiliza en la presente, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y sitio de unión. Esta región consiste en un dímero de una región variable de cadena pesada y ligera en una asociación no covalente, hermética (dímero  $V_{H-V_L}$ ). En esta configuración, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  juntos definen un sitio de unión de antígeno con especificidad de unión de antígeno en la superficie del dímero  $V_{H-V_L}$ .

Los términos “scFv”, “Fv de cadena sencilla”, y “fragmento variante de cadena sencilla” se utilizan de manera intercambiable y significan designar un anticuerpo o porción de un anticuerpo en el cual la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo de cadena doble tradicional se han unido para formar una cadena. Típicamente, un conector se inserta entre las dos cadenas para permitir el doblado y creación apropiada de un sitio de unión activo.

La expresión “anticuerpo de llama”, como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo o parte de un anticuerpo derivado de llama. El término “anticuerpo de camello”, como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo o parte de un anticuerpo derivado de camello. El término “anticuerpo de tiburón”, como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo o parte de un anticuerpo derivado de tiburón. Los anticuerpos de llama, camello y tiburón tienen una porción de unión de antígeno que se forma por un dominio sencillo,  $V_{H/H}$ , (en lugar de una cadena  $V_H$  y  $V_L$ ).

La expresión “dominio que emplea célula T”, como se utiliza en la presente, significa referirse a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de células T. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea célula T a dicho antígeno activa dicha célula T. De manera similar, la expresión “dominio que emplea célula NK” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de células Asesinas Naturales. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea célula NK a dicho antígeno activa dichas células Asesinas Naturales. La expresión “dominio que emplea células macrófago” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de células macrófago. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea células macrófago a dicho antígeno activa dichas células macrófago. La expresión “dominio que emplea monocito” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de monocitos. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea monocito a dicho antígeno activa dichos monocitos. La expresión “dominio que emplea granulocito” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de granulocitos. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea granulocito a dicho antígeno activa dichos granulocitos. La expresión “dominio que emplea granulocitos de neutrófilo” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno que está presente en la superficie celular de granulocitos de neutrófilo. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea granulocitos de neutrófilo a dicho antígeno activa dichos granulocitos de neutrófilo. La expresión “dominio que emplea macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados” se refiere a un dominio que se une específicamente a un

antígeno que está presente en la superficie celular de macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados. Preferentemente, la unión de dicho dominio que emplea macrófagos, monocitos y/o granulocitos de neutrófilo activados a dicho antígeno activa dichos monocitos y/o macrófagos.

5 La expresión “molécula capaz de mediar bioluminiscencia”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula (o parte funcional de una molécula) que tiene una actividad enzimática, la cual en la presencia del sustrato o sustratos apropiados cataliza una reacción que causa bioluminiscencia. El término incluye luciferasas, tales como las luciferasas de luciérnaga o *Gaussia*.

10 La expresión “variante GFP”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* al introducir alteraciones que resultan en mayor fluorescencia o luz irradiada en diferentes colores. El término significa incluir, entre otros, YFP (proteína fluorescente amarilla), CFP (proteína fluorescente cian), Venus (Nagai T et al., A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol. 2002 Jan;20(1):87-90), Cerulean (CFP aumentada con sustituciones de S72A, Y145A y H148D).

15 “GFP Aumentada” (y, análogamente, “YFP aumentada”, “CFP aumentada”) se refiere a una GFP (YFP, CFP) que se ha “humanizado”, como se reporta en Kain et al. (1995) Biotechniques 19(4):650-55. “Humanizado” se refiere a cambios hechos a la secuencia de ácido nucleico de GFP (YFP, CFP) para optimizar los codones para expresión de la proteína en células humanas.

20 La expresión “molécula de complementación de fluorescencia bimolecular”, como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula fluorescente que puede proporcionarse como dos fragmentos, que por sí mismos no son fluorescentes, pero que en la heterodimerización entre los dos fragmentos forman un dímero que es capaz de fluorescencia.

25 La expresión “compuesto terapéutico”, como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto adecuado para prevenir, tratar, aliviar o curar una enfermedad o estado de enfermedad. Preferentemente, un “compuesto terapéutico” es un compuesto que, en la entrada en una célula, es capaz de causar la muerte de esa célula. En algunas realizaciones, un compuesto terapéutico puede ser un compuesto radiactivo o químico que daña estructuras celulares vitales o interrumpe procesos celulares vitales.

30 La expresión “compuesto de diagnóstico”, como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto que puede detectarse por métodos de detección comunes, tales como métodos utilizados en los laboratorios de diagnóstico clínico o bioquímico o médico, por ejemplo un compuesto fluorescente, un compuesto radiactivo, o una molécula que media bioluminiscencia.

35 La expresión “células progenitoras/precursoras” significa referirse a células inmaduras, no diferenciadas o parcialmente diferenciadas que se encuentran típicamente en animales/humanos post-natales y tienen el potencial para diferenciarse en un tipo celular específico o en tipos de células específicos. El término “células progenitoras/precursoras de un tumor” designa células progenitoras/precursoras con propiedades alteradas (por ejemplo, considerando su conducta de proliferación o patrón de expresión genética) que da origen a células de tumor. Los ejemplos para tales células progenitoras/precursoras de un tumor son por ejemplo, células progenitoras o precursoras leucémicas.

40 El término “cáncer”, como se utiliza en la presente, se refiere a una célula maligna, grupo de células, o neoplasia maligna. El término significa comprender carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemias, tumores de célula germinal, y blastomas. Una “célula cancerosa” es una célula que es parte de o derivada de un cáncer. El término “tumor” se utiliza de manera intercambiable con el término “cáncer”.

45 Como se utiliza en la presente, La expresión “tumor hematológico” se refiere a un cáncer de la sangre o sistema formador de sangre (tales como células de médula ósea, células de formadoras de sangre, y células precursoras de células sanguíneas maduras). En algunas realizaciones, el término “tumor hematológico” se refiere a una neoplasia hematológica. Como se utiliza en la presente, el término “tumor no hematológico” se refiere a un tumor que no es un tumor hematológico.

50 La expresión “un paciente que se somete a trasplante alogénico de célula o tejido”, como se utiliza en la presente, se refiere a una situación donde un paciente recibe o ha recibido células trasplantadas o tejido trasplantado que se ha(n) obtenido de otra persona. Una situación preferida en cuanto a este aspecto es la situación con antígenos HLA incompatibles. La unidad “ $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ”, como se utiliza en el presente documento en el contexto de una cantidad de un polipéptido administrado, se refiere a una cierta cantidad de polipéptido por metro cuadrado de superficie corporal del paciente a quien se administra dicho polipéptido (el péptido puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada, tal como por inyección intravenosa o subcutánea). Por ejemplo, la expresión “la cantidad de polipéptido administrada es 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  por día para el polipéptido P1.” significa referirse a una situación donde la cantidad de polipéptido P1 administrada por día es 50  $\mu\text{g}$  por metro cuadrado de superficie corporal del paciente a quien se administra el polipéptido P1. En el caso de un paciente que tiene una superficie corporal de 2  $\text{m}^2$  esto



significaría que se administran 100 µg de polipéptido P1 por día.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que con un conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención pueden superarse los problemas indicados por encima de la técnica anterior y pueden realizarse los objetos descritos arriba. Igualmente, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que con un conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención, las células con una combinación específica de dos antígenos pueden identificarse y/o eliminarse con alta especificidad y efectos secundarios reducidos.

Es una ventaja de la estrategia combinatoria de la invención que se utilicen las unidades F no preformadas (por ejemplo unidades anti-CD3). F1 y V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> CD3 no se heterodimerizan *per se*, no incluso en la presencia de un agente que estabiliza su dimerización (por ejemplo un antígeno capaz de unirse al dominio F, como por ejemplo, CD3, HIS o DIG), y de esta manera no resulta en un dominio F funcional (por ejemplo no estimula células T). Exclusivamente en situaciones donde ambas construcciones complementarias, P1 y P2, se unen en la superficie de una célula dada, los dos componentes F1 y F2 reconstituyen el dominio F (por ejemplo, el sitio de unión CD3). De esta manera, la función del dominio F (por ejemplo activación de célula T) tiene lugar precisamente donde sea necesario pero no sistémicamente. Por consiguiente, puede asumirse que la estrategia combinatoria de la invención tiene menos efectos tóxicos, por ejemplo en comparación con estrategias de anticuerpo biespecíficas normales. Esto también se pone en evidencia por los ejemplos anexos, en particular por el modelo *in vivo* para trasplante alogénico, donde ratones positivos para HLA-A2 no sufren de ningún efecto clínico después de infusión de construcciones reactivas HLA-A2.

En particular, a células de etiqueta que expresan una firma de antígeno predefinida, se designan dos polipéptidos de cadena sencilla como partes de la construcción bipartita (bimolecular) final (construcción de anticuerpo bimolecular/triespecífica), cada uno compuesto de un fragmento variable de cadena sencilla de unión a antígeno (scFv) y ya sea el dominio de cadena ligera variable (VL) o pesada variable (VH) de un anticuerpo. Cuando estos dos fragmentos híbridos unen sus antígenos respectivos en la superficie de una sola célula, los dominios VL y VH interactúan entre sí para reconstituir el sitio de unión a antígeno original y de esta manera cumplir los requerimientos deseados.

Como se menciona, es una ventaja del conjunto de polipéptidos de la invención que la unión de ambos antígenos dirigidos en la superficie celular es requisito para heterodimerización funcional. El auto-ensamble de las dos partes complementarias y la estimulación de la célula T subsiguiente después de la unión de solamente un brazo a su antígeno puede regularse, corroborando de esta manera los datos publicados que demuestran que la unión de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> por sí mismo es de baja afinidad y que los heterodímeros V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> tienden a disociarse rápidamente en la ausencia de antígeno (Colman, 1987, *Nature* 326, 358-363; Amit, 1986, *Science* 233, 747-753; Law, 2002, *Int Immunol* 14, 389-400; Ueda, 1996, *Nat Biotechnol* 14, 1714-1718).

En contraste a los dominios de homo- o hetero-dimerización bien conocidos en la materia (cremallera de leucina, dominios Fc, perilla en el agujero etc), las interacciones de VH y HL son de baja afinidad. Sin embargo, se ha mostrado que la interacción de VH/VL puede estabilizarse después de unirse al antígeno específico. Sin limitarse por teoría, la interacción de VH/VL de acuerdo con esta invención tiene lugar solamente en situaciones después de que ambos fragmentos se han unido previamente a sus antígenos dirigidos similares, por ejemplo en la superficie de una célula dirigida. También sin limitarse por teoría, después de unión en diana simultáneo, las construcciones se acercan de manera que forman un complejo trimérico con el antígeno. El heterodímero triespecífico de esta manera complementado en diana de la invención es funcional con respecto a la función del dominio F, por ejemplo, emplea y estimula las células T para destrucción de la célula de tumor si se reconstituye anti CD3.

Además de la ventaja de las construcciones de la invención P1 y P2, por ejemplo, la naturaleza combinatoria de la respuesta inmune obtenida, se encontró sorprendentemente en el contexto de esta invención que la construcción bimolecular con el dominio F interrumpido, por ejemplo, scFv-anti CD3, despliega efectos no fuera de diana.

El conjunto de polipéptidos de acuerdo con esta invención, en particular los polipéptidos P1 y P2 comprendidos en el mismo, tienen la ventaja adicional de ser más estable y/ o tener una vida en el estante mejorada (en particular a 4 °C) en comparación con construcciones biespecíficas convencionales como construcciones BITE. Estas construcciones biespecíficas convencionales tienden a añadirse (en particular a 4 °C).

Se contempla que los polipéptidos de esta invención P1 y P2, más particular de F1 y F2 como se comprenden en los mismos, más particular de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que pueden comprenderse en los mismos, debido a su interfase hidrofóbica, son capaces de unir albúmina. Esto conduce a un tiempo de retención mejorado; es decir, biodisponibilidad más larga *in vivo* pero también *in vitro*, como, o ejemplo, en muestras de sangre o suero.

El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la presente invención comprende un primer polipéptido P1 y un segundo polipéptido P2. El primer polipéptido P1 comprende a primera porción dirigida T1 (que es capaz de unirse específicamente a un antígeno A1) fusionado a un primer fragmento F1 de un dominio funcional F (véase Figura 1A, parte superior). El segundo polipéptido P2 comprende una segunda porción dirigida T2 (que es capaz de unirse específicamente a un antígeno A2) enlazada a un segundo fragmento F2 del dominio funcional F (véase Figura 1A,

parte inferior). De manera importante, los fragmentos F1 resp. F2 del dominio funcional son no tóxicos por sí mismos e incapaces de ejercer cualquier función biológica al menos que haya compañerismo entre los dos polipéptidos P1 y P2. Cuando ambos polipéptidos P1 y P2 simultáneamente se unen a sus antígenos en la superficie de una sola célula que expresa ambos antígenos A1 y A2, los fragmentos F1 y F2 del dominio funcional F se acercan, se heterodimerizan y de esta manera complementan la función biológica deseada (véase Figura 1B). Por el otro lado, una célula que expresa ya sea solamente antígeno A1 (Figura 1C) o solamente antígeno A2 (Figura 1D) o ninguno de los antígenos no causa complementación de la función biológica. De esta manera, la función biológica se logra con alta especificidad solamente en la presencia de células que tienen ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular en la unión simultánea de ambos polipéptidos P1 y P2 a tal una célula. Dependiendo de la naturaleza del dominio funcional F, pueden realizarse diferentes objetos, tales como identificación/detección o eliminación específica de células que expresan ambos antígenos A1 y A2.

En una realización ejemplificativa, este principio inventivo se aplica para la eliminación específica de células de tumor:

Nuevos análisis histopatológicos o de citometría de flujo han revelado que las células de tumor pueden detectarse y distinguirse de sus contrapartes no transformadas no por marcadores de superficie única sino por la expresión de combinaciones/perfiles de antígeno aberrante, como se sabe para neoplasias hematopoyéticas y cáncer y células madre de cáncer de varias otras procedencias. De esta manera, aunque un solo antígeno no puede ser suficiente para identificar específicamente una cierta célula de tumor, una combinación específica de dos antígenos puede permitir discriminar la célula de tumor de cualquier otro tipo de célula.

Por ejemplo, el conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención puede utilizarse para eliminar específicamente células de cáncer caracterizadas por la expresión simultánea de los antígenos CD33 y CD19 en su superficie celular. Esta combinación de antígenos se encuentra en ciertos tipos de células de leucemia aguda y distingue estas células de cualquier otra célula (tal como células no malignas), que pueden llevar ya sea CD33 o CD19 en su superficie celular, pero no llevan ambos, CD33 y CD19, en su superficie celular (Ossenkoppele et al., Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. Br J Haematol 2011, 153(4):421-36).

Para eliminar específicamente estas células leucémicas que llevan tanto CD33 como CD19 en su superficie celular, la primera porción dirigida T1 del primer polipéptido P1 puede ser un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para CD33. Como fragmento F1 del dominio funcional F, puede elegirse el dominio variable de cadena ligera V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti CD3. La segunda porción dirigida T2 del segundo polipéptido P2 puede ser un scFv específico para CD19. Como el fragmento F2 del dominio funcional F, puede elegirse el dominio variable de cadena pesada V<sub>H</sub> de aquel anticuerpo anti CD3. El dominio variable de cadena ligera V<sub>L</sub> y el dominio variable de cadena pesada V<sub>H</sub> del anticuerpo anti CD3 son cada uno no tóxico por sí mismo. También son incapaces de ejercer su función biológica (es decir, para unir efectivamente el antígeno CD3) al menos que exista compañerismo entre los polipéptidos P1 y P2.

En la presencia de una célula leucémica que tiene tanto CD33 como CD19 en su superficie celular, ambos polipéptidos P1 y P2 simultáneamente se unen a esa célula. Como una consecuencia, los fragmentos F1 y F2 del grupo funcional F (es decir, la cadena pesada y ligera del dominio variable anti CD3 Fv de ese anticuerpo anti-CD3) se acercan, se heterodimerizan y de esta manera complementan la función biológica deseada, permitiendo que el dímero de P1 y P2 se una específicamente a CD3.

CD3 es una molécula de superficie celular que está presente en la superficie de células T. La molécula es parte del complejo de señalización de célula T, y la reticulación de las moléculas CD3 en la superficie de una célula T después de la unión de un anticuerpo específico CD3 conduce a activación de la célula T. Al emplear los antígenos CD3 en la superficie de células T, los heterodímeros de polipéptidos P1 y P2 son capaces de reclutar células T y activarlas. Como un resultado, se obtienen los mecanismos efectores típicos de una respuesta de célula T citotóxica, conduciendo a lisis celular: liberación de gránulos líticos que contienen las proteínas citotóxicas, perforina, granzimas, y granulisina. Perforina forma poros en la membrana de la célula diana a través de los cuales pueden entrar las granzimas e inducir apoptosis. Estos efectos conducen a destrucción específica de células leucémicas que llevan tanto el antígeno CD33 como CD19 en su superficie celular.

Otras células diferentes a las células leucémicas no tienen tanto el antígeno CD33 como CD19 en su superficie celular. Por lo tanto, no pueden reclutar ambos polipéptidos P1 y P2, y no se logra la complementación de la capacidad de unión CD3 y empleo de linfocitos T positivos CD3. Consecuentemente, no se afectan otras células además de las células leucémicas, y se logra la destrucción de las células malignas con especificidad exquisita.

Esto está en contraste grave con anticuerpos biespecíficos convencionales. Una construcción biespecífica convencional que emplea células T y tiene especificidad para células que expresan CD33 mediaría la destrucción de todas las células positivas CD33. Ya que CD33 es marcador de linaje de mieloides que se expresa en muchas células mieloides y células progenitoras mieloides, la destrucción de estas células resultaría en aplasia de larga duración y probablemente muerte del paciente. Una construcción biespecífica convencional que emplea células T y tiene especificidad para células positivas CD19 conduciría a la eliminación de todas las células que llevan el antígeno

CD19 en su superficie celular. CD19 se expresa en un subconjunto significativo de B-linfocitos. La destrucción de estas células conduciría a un defecto grave del sistema inmune. De esta manera, además de eliminar las células leucémicas que expresan simultáneamente CD33 y CD19 en la superficie, la aplicación de anticuerpos biespecíficos convencionales con especificidad para CD33 y CD19 conduciría a eliminación de células mieloides y un subconjunto sustancial de B-linfocitos.

De esta manera, aunque los anticuerpos biespecíficos convencionales reconocen solamente un antígeno en la célula a eliminarse, la activación efectora de acuerdo con la presente invención requiere el reconocimiento simultáneo de dos antígenos específicos en la superficie de la célula a identificarse/eliminarse. En consecuencia, la presente invención logra especificidad significativamente mejorada y efectos secundarios reducidos.

Está claro para una persona experta en la materia que, dentro del principio de la presente invención, son posibles diversas variaciones a la realización ejemplificativa descrita arriba.

Por ejemplo, el planteamiento descrito en la realización ejemplificativa de arriba puede adaptarse fácilmente para la identificación/eliminación de otros tipos de células de tumor además de células de leucemia aguda positivas CD33 y CD19 simplemente al elegir porciones dirigidas apropiadas T1 y T2 que se unen específicamente a antígenos A1 y A2, respectivamente, que están presentes simultáneamente en las células a identificarse/eliminarse, pero no presentes simultáneamente en otros tipos de células. Como se cita arriba, muchas si no todas las células de cáncer (pero también células progenitoras/precursoras de células de cáncer) expresan un número moléculas de superficie celular que *per se* se expresan ampliamente en tejidos normales, pero son indicativas del fenotipo maligno si se expresan en una combinación no fisiológica. Por ejemplo, CD34 es un marcador para células madre hematopoyéticas y CD7 puede detectarse en un subconjunto de células linfoides. La combinación de CD34 y CD7, sin embargo, se asocia fuertemente con malignidad, y la co-expresión aberrante de los dos antígenos puede detectarse en una proporción sustancial de leucemias mielógenas agudas (Ossenkoppele et al., Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2011, 153(4):421-36.). De manera similar, la co-expresión aberrante de CD44 y CD117 se ha descrito para células madre de cáncer ovárico, CD44 y CD24 para células que inician cáncer de páncreas y la combinación de EpCAM y CD44 en células madre de cáncer de colon y mama (Natasha Y. Frank, Tobias Schatton, Markus H. Frank; The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest.* 2010; 120:41–50). Se ha encontrado que la expresión de CD24 y CD29, así como CD24 y CD49f es específica para carcinoma de mama (Vassilopoulos A et al. Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumours using markers for normal mammary stem cells. *Int J Biol Sci* 2008; 4:133-142). Igualmente, las combinaciones con niveles de antígeno altamente expresados son indicativas de un número de malignidades, como CD38 y CD138 para mieloma.

Además de las combinaciones de antígeno específicas de cáncer listadas arriba y aquellas conocidas de la bibliografía científica, las combinaciones adicionales de dos antígenos que se expresan simultáneamente en células de tumor específicas pero no en otras células, pueden derivarse en una manera directa por la persona experta en la materia.

Primeramente, la persona experta puede llegar a una combinación de antígenos que es específica para un cierto cáncer al combinar un antígeno que es específico para el estado maligno del tipo celular respectivo con un marcador del tipo celular o marcador de linaje celular apropiado. Por ejemplo, anhidrasa carbónica IX es un marcador fuertemente asociado con carcinoma de célula renal y metástasis de carcinoma de célula renal y de esta manera representa un marcador para el estado maligno de células renales. Este marcador ubicado en la membrana, sin embargo, también se expresa en células normales del tracto intestinal. Al seleccionar como segundo antígeno un marcador de linaje renal como acuaporina, la combinación resultante de dos antígenos es específica para células de carcinoma celular renal y células que resultan de metástasis de carcinoma celular renal, mientras ni las células de riñón no malignas (que no expresan anhidrasa carbónica IX) ni las células del tracto intestinal (que no expresan acuaporinas) se caracterizan por el par seleccionado de antígenos.

La información detallada acerca de marcadores para el estado maligno de varios tipos de células y acerca de marcadores para numerosos tipos de células o linajes celulares, está disponible en la bibliografía y fuentes en la web (véase abajo para detalles) o puede obtenerse por experimentación directa (véase abajo).

Ejemplos para marcadores del estado maligno de una célula incluyen: E-cadherina para células epiteliales y células de carcinoma de mama tipo ductal; Ca-125 para enfermedades Epiteloides y células de cáncer de ovario, células de adenocarcinoma y células de cáncer de mama; Her-2/neu para células de cáncer de mama; proteína de fluido de enfermedad quística densa (proteína BRST-2) para células de cáncer de mama; BCA-225 (glicoproteína asociada a carcinoma de mama) para células de cáncer de mama y pulmón; CA 19-9 (antígeno de carbohidrato 19-9) para células de cáncer de páncreas, vía biliar y tracto intestinal; CEA para células de cáncer colorectal; CD117 (c-kit) para células de médula (tumor estromal gastrointestinal (y células mieloides y mastocitos); CD30 para células de Reed-Sternberg (células B y células T activadas por Ki-1); antígeno Epitelial (BER-EP4), antígeno de membrana Epitelial, y Antígeno Relacionado al Epitelio (MOC-31) para células de cáncer epitelial; receptor del factor de crecimiento Epidérmico (HER1) para células de varios cánceres; receptor del factor de crecimiento derivado de Plaqueta (PDGFR) alfa para células de varios cánceres; marcador asociado con Melanoma/Mart 1/Melan-A para células de

melanoma; CD133 para poblaciones de células madre de cáncer y otras; TAG 72 (gp 72 asociado a tumor) para células de adenocarcinoma.

5 Ejemplos adicionales para marcadores para un estado maligno de una célula/células incluyen: EpCAM, CD19, HER-2, HER-3, HER-4, PSMA, MUC-1 (mucina), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, Lewis-Y, CD20, CD33, CD44v6, Wue-1, Antígeno de Célula de Plasma, IgE (unida a membrana), Proteoglicano de Sulfato de Condroitina de Melanoma (MCSP), STEAP, mesotelina, Antígeno de Célula Madre de Próstata (PSCA), sTn (antígeno Tn sialilado), FAP (antígeno de activación de fibroblasto), EGFRvIII, Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ , MT-MMPs, antígeno Cora, EphA2, L6 y CO-29, CCR5,  $\beta$ HCG, gangliósido GD3, 9-O-Acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil GM1, Poly SA, GD2, Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), Sonic Hedgehog (Shh), CCR8, precursor TNF-alfa, Antígeno A33, Ly-6, desmogleina 4, neopítipo de E-cadherina, Receptor de Acetilcolina Fetal, CD25, Sustancia del inhibidor Muellieriano (MIS) Receptor tipo II, endosialina, SAS, CD63, TF-antígeno, CD7, CD22, Ig $\alpha$ (CD79a), Ig $\beta$  (CD79b), G250, gp100, F19-antígeno y EphA2.

15 Ejemplos para antígenos que son específicos para un cierto tipo de célula/linaje celular o para unos pocos tipos de células/linajes celulares (marcadores del tipo celular/marcadores de linaje celular) incluyen: CD45 para células hematopoyéticas; CD34 para células endoteliales, células madre, y células estromales; CD33 para células mieloides; CD138 para células de plasma y un subconjunto de células epiteliales; CD15 para células epiteliales, mieloides, y Reed-Sternberg; CD1a para timocitos corticales, y células de Langerhans; CD2 para células tímicas, células T, y células Asesinas Naturales (NK); CD3 para células T; CD4 para células T auxiliares; CD5 para células T, un subconjunto de células B, y células de carcinoma tímico; CD8 para células T citotóxicas; CD20 para células B; CD23 para células B activadas; CD31 para células endoteliales; CD43 para células T, células mieloides, un subconjunto de células B, histiocitos, y células de plasma; CD56 para células NK; CD57 para células neuroendócrinas, y células NK; CD68 para macrófagos; CD79a para células B y de plasma; CD146 para el linaje celular endotelial; proteínas de agente tensioactivo para células de pulmón; sinaptofisina, CD56 o CD57 para células neuroendócrinas; receptor de acetilcolina nicotínico o quinasa específica muscular (MUSK) para células musculares; canal de calcio dependiente de voltaje (tipo P/Q) o canal de potasio dependiente de voltaje (VGKC) o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) para células musculares y neuronas; receptor TSH (hormona estimulante de tiroides) para glándula tiroides; amfifisina para células musculares; HepPar-1 para hepatocitos; gangliósido GQ1B, GD3 o GM1 para células neuronales; y glicoforina-A para células del linaje celular eritropoyético.

Debe observarse que hay situaciones donde puede ser ventajoso depender de los propósitos de la presente invención en un antígeno con una especificidad menos que perfecta para el tipo celular o linaje celular de interés. Por ejemplo en situaciones donde se sabe que no se encuentra un antígeno exclusivamente en el tipo de célula/linaje celular de interés y no en cualquier otro tipo de células/linajes o en situaciones donde no es posible confirmar la especificidad exclusiva de un antígeno, también antígenos que están presentes en uno o más otros tipos de células/linajes celulares además puede considerarse el tipo de célula/linaje celular de interés. Se aplica consideración similar para marcadores para el estado maligno de una célula, o incluso para la especificidad de la combinación de dos antígenos. De esta manera, hay por ejemplo situaciones donde para los propósitos de la presente invención se selecciona una combinación de dos antígenos que es específica no solamente para las células de interés, sino que también para uno o más (unos pocos) otros tipos de células/linajes celulares/clases de células malignas.

45 Segundo, la persona experta puede llegar a una combinación de antígenos que es específica para un cierto cáncer por experimentación directa. Esta puede comprender los pasos de (1) determinar los antígenos de superficie en las células de tumor a eliminarse y (2) identificar entre estos antígenos de superficie de célula de tumor, dos antígenos que no están presentes simultáneamente en otros tipos de células (o, en algunas realizaciones, presentes en solamente unos otros pocos tipos de células).

50 Con frecuencia, la experimentación no puede ser necesaria para determinar los antígenos de superficie en células de tumor a eliminarse, debido a que tal información puede ya estar disponible para el tipo de cáncer respectivo de la bibliografía impresa (véase, por ejemplo, David J. Dabbs, *Diagnostic immunohistochemistry*, Churchill Livingstone, 3rd edition (2010); o F Lin y J Prichard, *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*, Springer, New York, 1st edition (2011)). Incluso información más extensiva está disponible a través de fuentes en la web. Por ejemplo, el Proyecto de Anatomía de Genoma de Cáncer (CGAP) del Instituto de Cáncer Nacional de EE.UU. (NCI) ha determinado sistemáticamente el perfil de expresión genética de varias células normales, precáncer o de cáncer (Strausberg R<sub>1</sub>. The Cancer Genome Anatomy Project: building a new information and technology platform for cancer research. En: *Molecular Pathology of Early Cancer*, 1999, (Srivastava, S., Henson, D.E., Gazdar, A., eds. IOS Press), pp. 365-370). Los recursos generados por la iniciativa CGAP están libremente disponibles (<http://cgap.nci.nih.gov/>) e incluyen acceso a todos los datos CGAP y las herramientas de análisis necesarias. De manera similar, la Iniciativa de Caracterización de Genoma de Cáncer (CGCI) del Instituto Nacional se enfoca en herramientas para caracterizar los cambios genómicos incluidos en diferentes tumores, por ejemplo métodos de caracterización genómicos incluyendo análisis de eczema y transcriptoma utilizando segunda secuenciación de generación. La información generada por CGCI está disponible a través de una base de datos públicamente accesible (<http://cgap.nci.nih.gov/cgci.html>). De esta manera, en muchos casos la información acerca de la presencia o ausencia de varias proteínas de superficie celular conocidas en las células de tumor de interés puede derivarse al

verificar simplemente estas bases de datos públicamente accesibles. Si se desea, esta información puede entonces verificarse en un segundo paso por análisis inmunocitoquímico/inmunohistoquímico de células/tejido de tumor de acuerdo con los métodos descritos abajo.

5 Si no hay información disponible en las proteínas expresadas por las células/tejido de tumor de interés, la persona experta puede llevar a cabo una caracterización de los antígenos en las células/tejido de tumor por métodos inmunocitoquímicos/inmunohistoquímicos con un panel de anticuerpos (véase, por ejemplo, "Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions" por F Lin y J Prichard, Springer New York, 1st edition (2011); o "Using Antibodies: A Laboratory Manual" por E Harlow y D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)). En  
10 breve, una preparación histológica o células aisladas del tumor se incuban con un primer anticuerpo dirigido en un antígeno de superficie potencial y, después de un paso de enjuague, la incubación de un segundo anticuerpo dirigido contra el dominio Fc del primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo se etiqueta con un fluoróforo o una enzima como HRP (peroxidasa de rábano picante), para visualizar la expresión del antígeno dirigido. Los paneles de anticuerpos que pueden utilizarse para propósitos de evaluar por perfil el antígeno de alto rendimiento de antígenos  
15 de superficie celular están comercialmente disponibles de numerosos fabricantes.

Además, están comercialmente disponibles las herramientas específicamente dedicadas a caracterización celular proteómica de alto rendimiento para identificar y analizar la expresión de proteína de superficie celular, tales como la tecnología de conjunto de alto rendimiento a base de FACS (clasificación celular activada por Fluorescencia) BD  
20 FACS™ CAP (Perfil de Anticuerpo Combinatorio) de Becton, Dickinson & Company.

El análisis inmunocitoquímico/inmunohistoquímico/proteómico descrito arriba puede precederse (o, en algunos casos, reemplazarse) por evaluación por perfil de la expresión del gen de genoma amplio de células de tumor o por análisis espectrométrico de masa de las proteínas expresadas por las células/tejido de tumor de interés. Por  
25 ejemplo, evaluación por perfil de la expresión del gen de genoma amplio de células de tumor puede llevarse a cabo para verificar la expresión de varias moléculas de superficie celular, y la presencia de tales antígenos en la superficie celular de las células de tumor puede confirmarse entonces a través de los métodos de coloración a base de anticuerpo como se describe arriba.

30 Está disponible información adicional acerca de los planteamientos para caracterizar los antígenos de superficie de células (cáncer) en la bibliografía científica relevante (por ejemplo, Zhou J, Belov L, Huang PY, Shin JS, Solomon MJ, Chapuis PH, Bokey L, Chan C, Clarke C, Clarke SJ, Christopherson RI. La evaluación por perfil de antígeno de superficie de cáncer colorectal utilizando microconjuntos de anticuerpo con multiplexación de fluorescencia. J Immunol Methods. 2010;355:40-51; o Carter P, Smith L, Ryan M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. Endocr Relat Cancer. 2004;11:659-87).  
35

En una siguiente etapa, la persona experta puede identificar entre los antígenos de superficie celular de las células de tumor, una combinación de dos antígenos que no se expresa simultáneamente en otros tipos de células.

40 Con frecuencia, ya la bibliografía o bases de datos públicamente disponibles pueden proporcionar información detallada acerca de la presencia o ausencia de antígenos de otros tipos de células:

La expresión de diversas moléculas de superficie celular en diversos tipos de células se ha estudiado sistemáticamente por investigadores en las décadas pasadas por inmunofenotipo y evaluación por perfil de  
45 expresión genética de casi cualquier tipo celular del cuerpo. Por ejemplo, la información detallada en la expresión de más de 360 antígenos del "grupo de diferenciación" (o antígenos CD) está disponible en publicación (por ejemplo, "Leukocyte and Stromal Cell Molecules: The CD Markers" por Zola H, Swart B, Nicholson I, and Voss E; John Wiley & Sons, 1st ed. (2007)) y en bases de datos en línea (por ejemplo, www.hcdm.org/MoleculeInformation/tabid/54/Default.aspx), e incluye información en niveles de expresión y  
50 distribución de tejido de antígenos, así como información acerca de los anticuerpos reactivos de antígeno y los epítomos a los que se unen estos anticuerpos.

Igualmente, hay bases de datos públicamente disponibles que proporcionan acceso a una gran cantidad de datos genómicos generados por la comunidad científica. Por ejemplo, la plataforma de Omnibus de Expresión Genética (GEO) del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI) de los Estados Unidos (Barrett T et al., NCBI  
55 GEO: archive for functional genomics data sets—10 years in Nucleic Acids Res. 2011;39(Database issue):D1005-10) archiva y da acceso a una enorme colección de microconjunto, secuenciación de siguiente generación, y otras formas de datos genómicos funcionales de alto rendimiento, y proporciona además interfaces en base a la red y aplicaciones para fácil acceso a esta información (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).  
60

Una vez que un par de dos antígenos se ha identificado a través de estos recursos que parece estar ausente de otros tipos de células además de las células de tumor de interés, una persona experta en la materia puede validar fácilmente la capacidad de adecuación de la combinación de antígenos para desarrollo adicional de las construcciones de polipéptido P1 y P2. Tal validación de que la combinación identificada de dos antígenos de hecho  
65 no se expresa simultáneamente en otros tipos de células además de las células de tumor, puede llevarse a cabo por análisis inmunohistoquímico/inmunocitoquímico de una colección (opcionalmente grande) de tipos de células y/o

tejidos clasificados con anticuerpos contra los dos antígenos. Las células y tejidos de cualquier clase pueden obtenerse de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), de los departamentos de patología y de bancos de tejido asociados con las universidades e instituciones de investigación. Una combinación de antígenos adecuada se define como un par de anticuerpos que colorea exclusivamente las células de tumor, pero no tejidos saludables o células saludables (es decir, ambos anticuerpos del par colorean las células de tumor, pero no otros tejidos/células se colorean por ambos anticuerpos).

Debe observarse que, aunque en muchas situaciones el grado más alto de especificidad (preferentemente especificidad absoluta) es, por supuesto, deseable, hay situaciones en el que es aceptable un grado inferior de especificidad. Por ejemplo, si el conjunto de polipéptidos se utiliza para propósitos de diagnóstico, algún grado de reactividad cruzada con otros tipos de células o tejidos puede ser aceptable (especialmente en el caso de tumores sólidos, ya que la información de posición adicional ayuda a distinguir las células de tumor de células de reacción cruzada). Igualmente, si el conjunto de polipéptidos se utiliza para propósitos terapéuticos, algún grado de reactividad cruzada con otros tipos de células o tejidos también puede ser aceptable, dependiendo de la severidad de la enfermedad en un paciente tratado y del tipo de células/tejidos afectados por la reactividad cruzada. Otras situaciones donde puede ser aceptable un grado inferior de especificidad pueden originarse en el contexto de un escenario de trasplante (véase abajo).

En casos donde ningún indicio acerca de que una combinación de antígenos adecuada puede derivarse de la bibliografía o bases de datos públicas, la presencia/ausencia de los antígenos de superficie celular de las células de tumor de otros tipos de células puede verificarse por experimentación directa. Para este fin, una variedad de tipos de células y/o tejidos obtenibles de las fuentes indicadas arriba, puede someterse a la caracterización de célula proteómica, análisis inmunocitoquímico/inmunohistoquímico y/o evaluación por perfil de expresión genética. (Debe observarse que tal análisis de células/tejidos de no tumor tiene que llevarse a cabo solamente una vez para obtener datos que pueden utilizarse para el diseño de varias construcciones de acuerdo con la invención que pueden adaptarse para diversas situaciones de diagnóstica o terapéuticas diferentes). Al comparar los resultados obtenidos con la información acerca de los antígenos de superficie celular de las células de tumor de interés, puede identificarse fácilmente una combinación de dos antígenos que no está presente en cualquier otra célula además de las células de tumor de interés.

Un planteamiento sistemático similar para identificar un par de dos antígenos que es específico para células de tumor también se describe en una publicación reciente por Balagurunathan, que se basa en evaluación por perfil de la expresión genética de genoma amplio seguida por inmunohistoquímica (Yoganand Balagurunathan, Gene expression profiling-based identification of cell-surface targets for developing multimeric ligands in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2008;7: 3071-3080). Al utilizar los microconjuntos de ADN, los autores de ese manuscrito generaron bases de datos de perfiles de expresión genética de ARNm para un número sustancial de especímenes de cáncer pancreático y muestras de tejido normal. Los datos de expresión para genes que codifican moléculas de superficie celular se analizaron por un planteamiento computacional a base de regla multivariada para identificar combinaciones genéticas que se expresan preferencialmente en células de tumor pero no en tejidos normales. La co-expresión aberrante de antígenos que constituyen una combinación de antígenos específica de tumor se confirmó entonces utilizando técnicas de inmunohistoquímica convencional en tejido de tumor pancreático y microconjuntos de tejido normal.

Habiendo identificado y validado tal una combinación de antígenos que es específica para las células de tumor de interés, las construcciones de polipéptido P1 y polipéptido P2 pueden diseñarse por técnicas de ingeniería de proteína convencional y métodos de biología molecular (véase, por ejemplo, G Howard y M Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, CRC Press, 1st edition (2006); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)).

Para muchas moléculas de superficie celular, se caracterizan los anticuerpos monoclonales específicos y por lo tanto fácilmente disponibles. De esta manera, en muchos casos la persona experta puede tener acceso a las células de hibridoma de anticuerpos monoclonales que son específicos para los antígenos de la combinación identificada de antígenos. Teniendo la opción de elegir de un panel de anticuerpos específico para un antígeno dado, una persona experta en la materia puede elegir un anticuerpo reactivo que une un epítipo cercano a la membrana, para minimizar la distancia de la célula que expresa antígeno de la célula efectora (Bluemel C, Hausmann S, Fluhr P, Sriskandarajah M, Stallcup WB, Baeuerle PA, Kufer P. Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Ago;59(8):1197-209). Si no está disponible tal anticuerpo contra uno o ambos antígenos de la combinación identificada de antígenos, los anticuerpos monoclonales contra los antígenos pueden generarse por técnicas convencional (por ejemplo, G Howard and M Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, CRC Press, 1st edition (2006)). Igualmente, varias compañías ofrecen servicios completos para la generación de anticuerpos monoclonales hechos a la medida y células de hibridoma.

La codificación de ADN o ARNm para los dominios variables de los anticuerpos monoclonales de interés puede obtenerse de hibridomas por amplificación PCR o clonación (Orlandi R, Gussow PT, Jones: Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(10):3833-

3837; Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R, Ratner D: Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods* 2000, 233(1-2):167-177; Essono S, Frobert Y, Grassi J, Cremino C, Boquet D: A general method allowing the design of oligonucleotide primers to amplify the variable regions from immunoglobulin cDNA. *J Immunol Methods* 2003, 279:251-266; G Howard and M Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, CRC Press, 1st edition (2006)) o de vectores ya establecidos que comprenden la secuencia de ADN del fragmento variable del anticuerpo respectivo. Con frecuencia, la secuencia puede extraerse de bases de datos públicas, donde se depositan muchas secuencias, y entonces la construcción puede generarse incluso por síntesis de gen como se ofrece por varios proveedores de servicio comercial (por ejemplo, Creative Biolabs, Shirley, USA).

Para formar la construcción de polipéptido P1, la secuencia que codifica el fragmento variable Fv de un anticuerpo específico para el primer antígeno del par de antígenos identificados (u, opcionalmente, la secuencia de un fragmento variable de cadena sencilla derivada de esa secuencia) se utiliza para la primera porción dirigida (T1) y está unida a través de un conector adecuado (codificación, por ejemplo, para menos de 12 aa) a una secuencia que codifica el primer fragmento F1 de un dominio funcional (por ejemplo, el dominio V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti CD3). Del mismo modo, para formar la construcción de polipéptido P2 la secuencia que codifica el fragmento variable Fv de un anticuerpo específico para el segundo antígeno del par de antígenos identificados (u, opcionalmente, la secuencia de un fragmento variable de cadena sencilla derivada de esa secuencia) se utiliza para la segunda porción dirigida (T2) y está unida a través de un conector adecuado a una secuencia que codifica el segundo fragmento F2 de ese dominio funcional (por ejemplo, el dominio V<sub>H</sub> de un anticuerpo anti CD3).

Para cualquier construcción de un polipéptido P1 o P2 de acuerdo con la invención, se consideran las modificaciones a la construcción o a las secuencias utilizadas para formar la construcción para adaptar la construcción a necesidades específicas. Por ejemplo, puede modificarse una construcción en una manera que reduce o anula su inmunogenicidad en humanos. En caso de que una secuencia se derive de un anticuerpo de origen no humano, tal como un anticuerpo de murino, pueden llevarse a cabo las modificaciones a la secuencia, que resultan en una inmunogenicidad reducida en humanos mientras retiene o retiene sustancialmente las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo de origen (conocido por la persona experta como "humanizar" un anticuerpo/construcción).

Diversas modificaciones del procedimiento anteriormente descrito y adaptaciones para acomodar las realizaciones y variaciones descritas en esta aplicación son evidentes para la persona experta en la materia.

Además de las variaciones con respecto a los antígenos a los que se unen específicamente las porciones dirigidas T1 y T2, son posibles varias otras modificaciones. Por ejemplo, en lugar de fragmentos variantes de cadena sencilla (scFv) como porción dirigida T1 y/o T2, pueden emplearse otros tipos de anticuerpos monovalentes o estructuras similares a anticuerpo. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo/estructura similar a anticuerpo derivado de un anticuerpo de llama, camello o tiburón. Ya que los anticuerpos de llama, camello y tiburón tienen una porción de unión de antígeno que se forma por un dominio sencillo (en lugar de una cadena V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>), el polipéptido resultante P1 o P2 es mucho más pequeño y de esta manera puede penetrar mejor en tejidos de tumor.

Además, ya que muchos antígenos relevantes de tumor son receptores unidos a la superficie celular, Fv de cadena sencilla de porción dirigida T1 y/o T2 puede reemplazarse por el ligando natural o artificial de tal un receptor unido a superficie celular. Como anticuerpos, estos ligandos naturales o artificiales confieren excelente especificidad hacia el receptor dirigido. Alternativamente, la porción dirigida T1 y/o T2 puede ser un aptámero.

Igualmente, para mejorar la afinidad de unión de un resto diana hacia el antígeno, la porción dirigida puede multimerizarse y/o alterarse por glicosilación u otros tipos de modificación post-traslacional o química u optimizarse a través de mutagénesis dirigida in situ o un proceso de selección de despliegue en fago.

Igualmente, los fragmentos F1 y F2 (es decir, los fragmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de Fv anti CD3 en la realización ejemplificativa anteriormente descrita) pueden reemplazarse por fragmentos de un dominio funcional F diferente, resultando en un efecto biológico diferente en la complementación de los dos fragmentos. Al utilizar fragmentos de anti CD56, anti CD1a, o anti CD16a, pueden reclutarse y activarse células asesinas naturales. Al utilizar fragmentos de anti CD16, pueden reclutarse y activarse células asesinas naturales, leucocitos polimorfonucleares de neutrófilo, monocitos y macrófagos. Al utilizar fragmentos de anti CD32a, anti CD32b, anti CD89, anti CD16a, o anti CD64, pueden reclutarse y activarse macrófagos. Al utilizar fragmentos de anti CD32a, anti CD32b, anti CD64, o anti CD89, pueden reclutarse y activarse monocitos. Al utilizar fragmentos de anti CD16b, anti CD89, anti CD32a, anti CD32b, o anti CD64, pueden reclutarse y activarse granulocitos. Igualmente, alternativamente a anti CD3, también pueden reclutarse y activarse células T al utilizar fragmentos de anti CD2, anti CD5, anti CD28, o anti TCR (receptor de célula T). Información adicional u opciones adicionales que consideran el reclutamiento y activación de células efectoras a través de unión de anticuerpo, están disponibles a partir de la bibliografía publicada, por ejemplo, "Bispecific Antibodies" por Roland E. Kontermann (editor), Springer Berlin Heidelberg; 1a Edición. (2011).

Una opción adicional es utilizar un conjunto de polipéptidos P1 y P2 con fragmentos F1 y F2 de un dominio funcional F que une un antígeno en una célula efectora en la complementación de los dos fragmentos, pero en el que la unión a este antígeno de la célula efectora no causa activación de dicha célula efectora. Este conjunto de polipéptidos ("primer conjunto de polipéptidos") se utiliza entonces (por ejemplo, administra a un paciente) en combinación con un segundo conjunto de polipéptidos con fragmentos de un dominio funcional F que en la complementación se une a un segundo antígeno diferente en la misma célula efectora, pero en el que unir de nuevo a este antígeno de la célula efectora no causa activación de la célula efectora. Los antígenos a los cuales el primer y el segundo conjuntos de polipéptidos se unen se eligen en una manera que, mientras la unión de solamente uno de los dos antígenos en las células efectoras no resulta en activación de la célula efectora, la unión de ambos antígenos en la célula efectora simultáneamente conduce a activación de la célula efectora. Esto tiene las ventajas que (1) pueden utilizarse los antígenos en células efectoras que no funcionan individualmente, pero requieren la coestimulación de un segundo antígeno, y (2) el número de diferentes antígenos que dicta la especificidad con la cual una cierta célula (tal como una célula cancerígena) se diferencia de otras células, puede incrementarse de dos (si el primer y segundo conjunto de polipéptidos tienen las mismas porciones dirigidas T1 y T2, respectivamente) hasta cuatro antígenos diferentes (si el primer y segundo conjunto de polipéptidos no tienen porción dirigida en común).

Los efectos similares pueden lograrse con dos conjuntos de polipéptidos con diferentes porciones dirigidas, pero el mismo dominio funcional. Estos conjuntos de polipéptidos se diseñan para tener un dominio funcional dirigido contra un antígeno de célula efectora que permite normalmente que cada conjunto de polipéptidos por sí mismo active la célula efectora. Sin embargo, ambos conjuntos de polipéptidos se utilizan en una concentración que es solamente demasiado baja para causar la activación eficiente de la célula efectora. Si ambos conjuntos de polipéptidos están presentes simultáneamente (por ejemplo, en la administración simultánea a un paciente), cada conjunto de polipéptidos por sí mismo no es capaz de activar la célula efectora (debido a su baja concentración), mientras la combinación de ambos conjuntos de polipéptidos si lo es (debido a que los efectos de los dos conjuntos de polipéptidos actúan sinérgicamente y de esta manera la suma de los efectos causados por los dos conjuntos de polipéptidos es suficiente para activar la célula efectora).

Como otra alternativa para reclutamiento/activación de células efectoras, puede seguirse un planteamiento "predirigido", como se establece bien para construcciones de anticuerpos biespecíficas (Cancer Imaging and Therapy with Bispecific Antibody Pretargeting. Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Boerman O, Sharkey RM. Update Cancer Ther. 2007 Mar;2(1):19-31). Para este fin, F1 y F2 se sustituyen por fragmentos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo específico para un antígeno, una molécula portadora (es decir, una molécula/parte de una molécula que no se reconoce como extraña por el sistema inmune del paciente a quien se administra dicho conjunto de polipéptidos o una molécula que no causa o solamente causa una reacción inmune débil por un paciente a quien se administra) o una etiqueta de afinidad. Subsiguiente (o simultáneamente) a administrar los polipéptidos P1 y P2, se administra un compuesto de diagnóstico o terapéutico acoplado a dicho antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad. Solamente las células que llevan ambos antígenos A1 y A2 en su superficie se unen por ambos polipéptido P1 y polipéptido P2. Consecuentemente, solamente en estas células, la complementación funcional conduce a la generación de un sitio de unión capaz de reclutar el compuesto de diagnóstico o terapéutico a través de dicho antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad. Este planteamiento permite el direccionamiento exclusivo de células dirigidas combinadas con la posibilidad de administración y dosificación precisa de compuestos terapéuticos como toxinas o sustancias radioactivas o compuestos de diagnóstico, mientras las células que no expresan los antígenos o expresan solamente uno de los antígenos no se afectan.

Una molécula portadora adecuada, puede por ejemplo ser un péptido o una molécula de carbohidrato. Preferentemente, la molécula portadora puede ser gelatina, dextrano, o almidón de hidroxi-etilo, que son expansores de plasma comunes que son metabólicamente inertes, permanecen en la sangre y, si son suficientemente pequeños, se eliminan renalmente. Alternativamente, la molécula portadora puede ser inulina, una molécula metabólicamente inerte que se utiliza rutinariamente en la clínica para la determinación de espacio glomerular (y, además, existen anticuerpos que reconocen específicamente inulina).

Una etiqueta de afinidad adecuada puede ser, por ejemplo, una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST), una etiqueta de hemaglutinina (HA), una etiqueta de polihistidina (His), o una etiqueta de proteína de unión de maltosa (MBP), una etiqueta de digoxigenina (DIG).

El compuesto terapéutico acoplado al antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad puede, por ejemplo, ser un compuesto radiactivo o una toxina.

Los compuestos radiactivos adecuados son, por ejemplo, compuestos que comprenden <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>131</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>10</sup>B, o <sup>213</sup>Bi. El reclutamiento del antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad enlazada al compuesto radiactivo a células que expresan tanto el primer como el segundo antígeno conduce a acumulación de radioactividad sobre el sitio de tumor, resultando en destrucción específica de células/tejido de tumor.

Alternativamente, el compuesto terapéutico acoplado al antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad puede, por ejemplo, ser un compuesto tóxico que no es capaz de cruzar la membrana celular sin unión previa a la superficie celular.



Este prerrequisito se cumple por los componentes A de las toxinas AB clásicas derivadas de un número de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *B. anthracis* y otros. Las toxinas AB son complejos de proteína de dos componentes que interfieren con las funciones internas de la célula. El componente A es el componente “activo” (es decir, mata una célula en la penetración de membrana), pero no es capaz de cruzar la membrana celular por sí mismo. El componente B es el componente de “unión” que por sí mismo no es tóxico, pero es esencial para la toma y penetración de membrana del componente A.

Por ejemplo, el antígeno protector (PA) *Bacillus anthracis* es un componente B de toxina clásica que media la toma del factor de edema de exotoxinas de ántrax actual y el factor letal (LF). LF sin el componente PA no es tóxico ya que LF por sí mismo no penetra las membranas y de esta manera no puede ejecutar sus capacidades patógenas (Pezard C, Berche P, Mock M. "Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*" 1991 Infect. Immun. 59 (10): 3472). Sin embargo, cuando se une a moléculas de superficie celular, LF se interioriza y es altamente tóxico a la célula.

En la dimerización de los polipéptidos P1 y P2, se reconstituye la función del dominio funcional F. A través de la interacción del dominio funcional reconstituido con el antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad acoplada a la toxina, la toxina se recluta a la membrana celular de las células dirigidas, se incorpora en las células y mata las células.

Este principio se adapta fácilmente a los propósitos de la invención por la persona experta, ya que se utiliza ampliamente en las así llamadas inmunotoxinas, donde un resto diana, principalmente un dominio similar a anticuerpo o ligando natural, se acopla al componente de toxina (véase, por ejemplo, Immunotoxins for targeted cancer therapy. Kreitman RJ, AAPS J. 2006 Aug 18;8(3):E532-51). Los ejemplos incluyen inmunotoxinas en base a toxina de difteria (tal como Denileukin difitox (marca comercial de EE.UU. Ontak) que se ha aprobado por FDA para el tratamiento de algunos linfomas de célula T) o a base del Factor Letal *B. anthracis* (Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ (2007). "Immunotoxin treatment of cancer". Annu. Rev. Med. 58: 221–37).

Los componentes A adecuados de las toxinas AB pueden, por ejemplo, ser factor de edema *B. anthracis*, factor letal *B. anthracis*, toxina iota *C. perfringens*, toxina C2 *C. botulinum*, ADP-ribosiltransferasa *C. difficile*, fragmento A de toxina de difteria *C. diphtheriae*.

Alternativamente, el compuesto terapéutico puede, por ejemplo, ser un compuesto citotóxico que es tóxico en la entrada en una célula y que es capaz de cruzar la membrana celular por sí mismo sin unión previa a la superficie celular. En este caso, el antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad al(la) cual se acopla el compuesto terapéutico se selecciona de manera que previene que el conjugado resultante (es decir, el compuesto terapéutico unido al antígeno/molécula portadora/etiqueta de afinidad) cruce las membranas celulares y entre en las células sin unión anterior del conjugado a la superficie celular (una molécula portadora adecuada puede, por ejemplo, ser un portador de almidón de hidroxiethyl). De esta manera, tal un conjugado no entra en las células sin unión previa a su superficie celular; una vez que tal un conjugado se une a la superficie celular, sin embargo, se interioriza en la célula y el compuesto tóxico mata la célula. El conjugado no se une a las células, al menos que se reclute en la presencia del conjunto inventivo de polipéptidos a células que simultáneamente expresan ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular. Tales células se unen y reclutan ambos polipéptidos P1 y P2, y el dominio funcional reconstituido se une específicamente a y recluta el antígeno/molécula portadora/etiqueta de afinidad que, a su vez, resulta en la interiorización del compuesto terapéutico. En consecuencia, se realiza una muerte específica de células que llevan ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular. Los compuestos citotóxicos que pueden utilizarse en este contexto incluyen por ejemplo, auristatina, ricina, saponina, briedina 1, bouganina, gelonina, proteína antiviral de *Phytolacca americana* (PAP), antifolatos, alcaloides vinca, antraciclinas, caliqueamicina, ribonucleasa, abrina, modecina, o Listeriolisina O.

El compuesto de diagnóstico acoplado al antígeno, molécula portadora o etiqueta de afinidad puede, por ejemplo, ser un compuesto radiactivo, un fluoróforo, o un compuesto capaz de mediar bioluminiscencia.

Los compuestos radiactivos adecuados son, por ejemplo, compuestos que comprenden  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  o  $^{201}\text{Tl}$ . Tales compuestos se detectan por procedimientos de formación de imágenes médicos bien conocidos en la clínica.

Alternativamente, un compuesto fluorescente puede utilizarse como compuesto de diagnóstico, tal como GFP (proteína fluorescente verde) o una variante GFP (por ejemplo, BFP (proteína fluorescente azul), CFP (proteína fluorescente cian), o YFP (proteína fluorescente amarilla)), o un compuesto de molécula pequeña fluorescente como FITC (isotiocianato de fluoresceína) o PE (ficoeritrina), tintes alexa flúor (tal como AlexaFluor488 y tintes relacionados vendidos por Molecular Probes, por ejemplo) o tintes de cianina (tales como Cy3 (Indocarbocianina) o Cy5 (Indodicarbocianina) o tintes relacionados).

Alternativamente, un compuesto capaz de mediar bioluminiscencia puede utilizarse como compuesto de diagnóstico, tal como una luciferasa, por ejemplo luciferasa de *Gaussia* (Chopra A. *Gaussia princeps* luciferase. In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [base de datos en línea]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2004-2012. Disponible de: <http://micad.nih.gov>). Se establece bien el empleo de luciferasa de

*Gaussia* para formación de imágenes *in vivo* (véase, por ejemplo, Santos EB et al. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound *Gaussia princeps* luciferase. Nat Med. 2009 Mar;15(3):338-44. Epub 2009 Feb 15; o Inoue Y et al. *Gaussia luciferase* for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. Mol Imaging. 2011 Oct 1;10(5):377-85. doi: 10.2310/7290.2010.00057. Epub 2011 Abr 26; véase también abajo para detalles adicionales).

Igualmente, los fragmentos F1 y F2 (es decir, los fragmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de Fv anti CD3 en la realización ejemplificativa anteriormente descrita) pueden reemplazarse por fragmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un anticuerpo que es específico para un compuesto de diagnóstico o terapéutico (es decir, en este caso, el dominio funcional F es capaz de unirse directamente al compuesto de diagnóstico o terapéutico). Aquí, pueden considerarse los mismos compuestos de diagnóstico y terapéuticos como se describen arriba en el contexto del planteamiento "predirigido".

Adicionalmente, se describe en el presente documento que los fragmentos F1 y F2 (es decir, los fragmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de Fv anti CD3 en la realización ejemplificativa anteriormente descrita) pueden reemplazarse por fragmentos de un compuesto fluorescente o bioluminiscente que son biológicamente inactivos por sí mismos, pero recuperan su función (es decir, su capacidad para mediar la fluorescencia o bioluminiscencia) al asociar los dos fragmentos y complementación funcional, permitiendo de esta manera la identificación específica de células que llevan ambos antígenos A1 y A2.

Un número de moléculas fluorescentes que pueden utilizarse en este contexto se conocen bien y se caracterizan en la materia incluyendo, pero no limitándose a, GFP (proteína fluorescente verde), derivados GFP (como YFP (proteína fluorescente amarilla) y CFP (proteína fluorescente cian), Venus (Nagai T et al., A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol. 2002 Ene;20(1):87-90), o Cerulean (CFP Aumentado con sustituciones de S72A, Y145A y H148D)). Para estas moléculas, se describen los fragmentos de división que se auto-ensamblan en la situación de proximidad en un proceso llamado complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC).

Por ejemplo, GFP, CFP, Venus, Venus con una sustitución de M153T, o Cerulean puede dividirse después del aminoácido 155 (es decir, por ejemplo, fragmento F1 puede comprender aminoácidos 1-155 de GFP, mientras el fragmento F2 puede comprender aminoácidos 156-245 de GFP, o vice versa). Alternativamente, YFP o Venus pueden dividirse después del aminoácido 173. Los detalles adicionales en GFP de división y variantes de GFP de división pueden encontrarse en Kerppola TK., Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. Chem Soc Rev. 2009;38:2876-86.

Un ejemplo de una molécula que media bioluminiscencia y que puede utilizarse en este contexto es luciferasa de división. Es particularmente adecuada la luciferasa de *Gaussia princeps*, que no requiere que los cofactores sean activos y cataliza la oxidación del sustrato de luciferina de celentéreo (coelenterazina) en una reacción que emite azul claro, o derivados de luciferasa de *Gaussia* (Remy I and Michnick S, A highly sensitive protein-protein interaction assay based on *Gaussia* luciferase. Nature Methods - 3, 977 - 979 (2006)). Por ejemplo, el fragmento F1 puede comprender un fragmento del término N de luciferasa de *Gaussia* a Gly-93, mientras el fragmento F2 puede comprender un fragmento de Glu-94 al término C de luciferasa de *Gaussia*, o viceversa (véase Remy I and Michnick S, Nature Methods, 2006 para detalles). Se ha establecido la aplicación del sistema de luciferasa de división de *Gaussia* *in vivo* (Luker et al., In vivo imaging of ligand receptor binding with *Gaussia* luciferase complementation. Nature Medicine 2011, doi:10.1038/nm.2590), que permite la adaptación directa para los propósitos de la presente invención por un experto.

La formación de imágenes intravital de lesiones de tumor es de importancia eminente en casos donde las células de cáncer infiltran los tejidos y la eliminación completa de todas las células transformadas es prerequisite para cura. Un cirujano que busca las células de cáncer diseminadas en el sitio de operación puede utilizar GFP de división o derivados de GFP de división fusionados a las porciones dirigidas y un láser ayuda al sistema de cámara de fluorescencia Multiespectral para la detección de células que expresan de manera aberrante un perfil de antígeno dirigido, similar al uso intraoperativo de fluorescencia o bioluminiscencia que ya se explota en algunos escenarios clínicos (van Dam GM et al., Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. Nat Med. 2011 Sep 18;17(10):1315-9; Luker et al., In vivo imaging of ligand receptor binding with *Gaussia* luciferase complementation. Nature Medicine 2011, doi:10.1038/nm.2590).

Para la detección de luciferasa de división complementada, es obligatoria la aplicación de un sustrato para luciferasa, que puede ser luciferina o coelenterazina. Coelenterazina se prefiere debido a que coelenterazina emite luz independiente de ATP y se establece bien para formación de imágenes *in vivo* y aplicaciones *in vivo*. Un cirujano será capaz de visualizar células de cáncer después de haber etiquetado el tumor con el polipéptido P1 y P2 e inyectar una cantidad no tóxica de coelenterazina intravenosamente.

En otra realización ejemplificativa, el principio inventivo se aplica en el contexto de un paciente quien padece de un tumor hematopoyético y quien recibió un trasplante de células hematopoyéticas sanas de otra persona (el donante). Aquí, el conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención puede utilizarse para la eliminación específica (o detección) de células hematopoyéticas malignas restantes del receptor después del trasplante de células

hematopoyéticas sanas del donante.

Para destruir las células hematopoyéticas malignas en un paciente que padece de un tumor hematopoyético, el paciente puede someterse a quimioterapia y/o terapia de radiación. Subsiguientemente, el paciente recibe un trasplante de células hematopoyéticas sanas de un donante.

Para minimizar el riesgo de rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra hospedador, se prefiere habitualmente el trasplante de tejido/células (por ejemplo, médula ósea) de un donante quien tiene el mismo conjunto de moléculas MHC (complejo de histocompatibilidad principal). Sin embargo, con frecuencia no puede identificarse un donante con el mismo conjunto de moléculas MHC ("donante con HLA idéntico"). Por lo tanto se emplean cada vez más, injertos de trasplante con una o dos incompatibilidades en el conjunto de variantes MHC, sangre de cordón sin relacionar con hasta tres incompatibilidades, o trasplantes haploidénticos. De acuerdo con lo anterior, es común que hay al menos una diferencia distintiva entre el conjunto de moléculas MHC expresadas por las células del receptor y las células del donante.

En el trasplante de acuerdo con esta realización ejemplificativa de la invención, se utilizan las células donantes que son distintas de las células receptoras con respecto a al menos una de sus variantes HLA. Esto significa que hay al menos un "antígeno distintivo" que está presente en la superficie celular de las células receptoras, pero no en la superficie celular de las células donantes. Por ejemplo, el antígeno distintivo puede ser HLA-A2, si el paciente (es decir, el receptor) es HLA-A2 positivo, mientras el donante es HLA-A2 negativo.

A pesar de la quimioterapia/terapia de radiación, las células hematopoyéticas malignas individuales del receptor pueden escaparse de la erradicación. Ya que las células hematopoyéticas malignas supervivientes son células receptoras, llevan el antígeno distintivo que diferencia las células receptoras de las células donantes. Al mismo tiempo, hay células de origen de linaje hematopoyético y de esta manera tienen marcadores de este linaje celular, tal como CD45, en su superficie celular. Los blastos leucémicos y otras células hematopoyéticas del paciente son las únicas células que despliegan simultáneamente el antígeno distintivo (aquí HLA-A2) y marcadores de linaje celular hematopoyético (aquí CD45). El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la invención explota este hecho para eliminar específicamente estas células.

Para este fin, la primera porción dirigida T1 del primer polipéptido P1 puede ser un scFv específico para el antígeno distintivo que está presente solamente en células receptoras (aquí HLA-A2). Como el fragmento F1 del dominio funcional F, puede elegirse la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) de un anticuerpo específico CD3 $\epsilon$ . La segunda porción dirigida T2 del segundo polipéptido P2 puede ser un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para CD45. Como el fragmento F2 del dominio funcional F, puede elegirse la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de dicho anticuerpo específico CD3 $\epsilon$ . (Naturalmente, igualmente es posible utilizar la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de un anticuerpo específico CD3 $\epsilon$  como el fragmento F1 y la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) de dicho anticuerpo específico CD3 $\epsilon$  como el fragmento F2. Como es evidente para una persona experta en la materia, este es un principio general, y generalmente es posible cambiar los fragmentos utilizados por el fragmento F1 y fragmento F2). No es  $V_L$  del anticuerpo específico CD3 $\epsilon$  capaz de emplear CD3 $\epsilon$  en la ausencia de  $V_H$ , ni  $V_H$  del anticuerpo específico CD3 $\epsilon$  capaz de emplear CD3 $\epsilon$  en la ausencia de  $V_L$ . De acuerdo con lo anterior, ni P1 ni P2 es por sí mismo capaz de unirse a CD3 $\epsilon$ .

Sin embargo, si tanto el antígeno distintivo (por ejemplo, HLA-A2) como el antígeno CD45 están presentes en una célula única, la unión a sus antígenos respectivos acerca los dos polipéptidos P1 y P2. Como una consecuencia, se ensamblan los dominios  $V_H$  y  $V_L$  no en par, resultando en heterodimerización de los polipéptidos P1 y P2 y en la formación de un fragmento de anticuerpo variable funcional Fv de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que es capaz de unirse a CD3 $\epsilon$  (véase Figura 2).

Como un resultado, las células T se reclutan y activan a través de CD3 $\epsilon$ , y la célula que lleva tanto HLA-A2 como CD45 en su superficie celular, se elimina específicamente por una respuesta de célula T citotóxica.

Una persona experta en la materia entiende que, dentro del principio de la presente invención, son posibles diversas variaciones a esta realización ejemplificativa.

Por ejemplo, en el polipéptido P2 el fragmento scFv que reconoce el marcador de linaje celular hematopoyético CD45 puede reemplazarse por un fragmento scFv que reconoce un marcador de un linaje celular o tipo celular diferente, es decir, la porción dirigida T2 puede ser un dominio que específicamente une un antígeno que es específico para un linaje celular diferente al linaje celular hematopoyético o para un cierto tipo celular (para una lista detallada de varios marcadores de linaje celular y marcadores de tipo celular que pueden utilizarse en este contexto véase David J. Dabbs, Diagnostic immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 3a edición (2010); o F Lin and J Prichard, Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions, Springer, New York, 1a edición (2011)). Para adaptar el conjunto de polipéptidos a un marcador de linaje celular/marcador de tipo celular alternativo, es suficiente reemplazar la porción dirigida T2 de polipéptido P2 con un resto diana que tiene especificidad de unión para el marcador de linaje celular/marcador de tipo celular alternativo, deseado.

Por ejemplo, en la situación de carcinoma de célula renal metastática (RCC), una persona experta en la materia puede consultar las bases de datos arriba citadas para información acerca de las proteínas de superficie celular con expresión restringida a células de riñón. Entre muchas otras moléculas, aprenderá que la expresión de ciertos miembros de la familia de acuaporina se confina a células de riñón y eritrocitos. Habiendo obtenido esta información, una persona experta en la materia construirá un polipéptido P2 que reconoce un miembro de la familia de acuaporina que se confina a células de riñón y eritrocitos fusionados a la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de un anticuerpo específico CD3 $\epsilon$ . En caso de que el paciente que padece carcinoma celular renal es HLA A2 positivo y un trasplante de riñón de un donante sano es HLA A2 negativo, el médico que trata al paciente puede utilizar las dos construcciones (anti-acuaporina fusionada a anti-CD3 ( $V_H$ ) y anti-HLA A2 fusionada a la cadena ligera ( $V_L$ ) de dicho anticuerpo específico CD3 $\epsilon$ ). En este caso, todas las células que expresan simultáneamente dicha acuaporina y HLA A2 se etiquetarán para lisis por las células T que son células de carcinoma celular renal y tejidos metastáticos. Las células de riñón donadas por el donante sano son HLA A2 negativas y no se atacarán. Ya que los eritrocitos pierden la expresión de HLA a lo largo del proceso de ontogenia y de esta manera no llevan las moléculas HLA en sus superficies, se utilizarán a pesar de expresar grandes cantidades de acuaporinas. De nuevo, una acuaporina de direccionamiento de anticuerpo biespecífico sin complementación, convencional mediaría la muerte de todas las células de riñón del donante y receptor así como los eritrocitos. Un anticuerpo biespecífico que dirige HLA A2 en un paciente HLA A2 positivo más probablemente sería fatal, ya que cada célula receptora excepto los eritrocitos expresan HLA A2 y pueden atacarse por las células T redirigidas.

Otro ejemplo es carcinoma hepatocelular (HCC). Los hepatocitos se incluyen grandemente en un número de procesos metabólicos incluyendo el tráfico de lipoproteínas. Para este fin, los hepatocitos expresan receptores para lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sus superficies (miembro 1 del receptor depurador clase B, SCARB1). El tratamiento de un paciente HLA A2 positivo que padece HCC que expresa SCARB1 en la superficie de células de tumor y metástasis puede realizarse por una construcción de Polipéptido P2 que comprende un dominio scFv que dirige SCARB1 fusionado a la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de dicho anticuerpo específico CD3 $\epsilon$  y un Polipéptido P1 (scFv anti-HLA A2 fusionado a la cadena ligera ( $V_L$ ) de dicho anticuerpo específico CD3 $\epsilon$ ) y trasplante de células de hígado de un donante HLA A2 negativo, sano. En este caso, todos los hepatocitos y células malignas derivadas de hepatocito que expresan ambos, SCARB1 y HLA A2, se etiquetarán para lisis por linfocitos T. Los hepatocitos del donante que carece de HLA A2 se utilizaron también como células donantes SCARB1 negativas que expresan HLA A2. Ya que la expresión de SCARB1 también se reportó para células que participan en síntesis de esteroide en la glándula adrenal, estas células probablemente también se destruirán por células T redirigidas, resultando en enfermedad de Addison.

Se conocen varios marcadores que son específicos para ciertos tipos de células o linajes celulares o unos pocos tipos/linajes de células (para una lista de ejemplos, véase arriba). Más información acerca de los marcadores de linaje, antígenos de diferenciación y marcadores de tejido así como su distribución de tejido está fácilmente disponible a partir de fuentes publicadas (véase, por ejemplo, David J. Dabbs, Diagnostic immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 3rd edition (2010); o F Lin and J Prichard, Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions, Springer, New York, 1st edition (2011)) y bases de datos públicas (tal como Gene Expression Atlas of the European Bioinformatics Institute (EBI), <http://www.ebi.ac.uk/gxa/>; o la plataforma de Gene Expression Omnibus (GEO), véase arriba). Igualmente, pueden identificarse y/o verificarse tales marcadores en una manera directa por un experto utilizando métodos similares como se describe arriba para la identificación de combinaciones específicas de tumor de antígenos.

En ciertas realizaciones preferidas, se utiliza un antígeno con especificidad menos perfecta para un cierto tipo celular o linaje celular (es decir, se utiliza un antígeno que está presente en más de uno, pero preferentemente solamente en unos pocos, tipos de células o linajes celulares). En algunas realizaciones, se utiliza un antígeno que se expresa por dicho tipo de célula/linaje celular a una tasa más alta o a una cantidad o proporción más alta que por otros tipos de células/linajes celulares, en el sentido que puede haber una expresión pequeña pero detectable de dicho antígeno también en otros tipos de células/linajes celulares.

El concepto puede adaptarse además a cualquier otro haplotipo HLA además de HLA-A2 utilizado en la realización ejemplificativa de arriba, siempre que las células receptoras sean positivas para este antígeno HLA y las células donantes sean negativas para él. Los antígenos HLA posibles incluyen, entre otros, HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A25, HLA B7, HLA B8, HLA B35, HLA B44 y HLA Cw3, HLA Cw4, HLA Cw6, HLA Cw7. Para adaptar el conjunto de polipéptidos a un antígeno HLA alternativo, es suficiente para reemplazar la porción dirigida T1 de polipéptido P1 con un resto diana que tiene especificidad de unión para el antígeno HLA alternativo, deseado. Por una elección apropiada de la porción dirigida T1, por supuesto, también es posible, por su puesto, eliminar específicamente células donantes.

Igualmente, en lugar de un dominio  $V_L$  y un dominio  $V_H$  que al ensamblarse forman un dominio capaz de unirse a CD3 $\epsilon$  (es decir, fragmento F1 y fragmento F2 de polipéptidos P1 y P2, respectivamente), el dominio  $V_L$  y dominio  $V_H$  pueden reemplazarse con dominios/fragmentos que al ensamblarse confieren una función diferente al dímero resultante. En este aspecto, son igualmente aplicables todas las variaciones descritas arriba para la realización ejemplificativa que se relaciona con la eliminación/detección de células de tumor identificadas por una combinación específica de dos antígenos de superficie celular. Por ejemplo, en ensamble, el dominio funcional complementado

puede mediar la unión/activación de otras células efectoras que las células T, puede adaptarse a un planteamiento "predirigido", puede unir un compuesto de diagnóstico o terapéutico, o puede formar una molécula fluorescente/molécula capaz de mediar bioluminiscencia.

5 Por su puesto pueden considerarse las diversas opciones para la elección de los fragmentos F1 y F2 y para la elección de las porciones dirigidas T1 o T2 descritas arriba en la realización ejemplificativa que se relaciona con la aplicación del principio inventivo para la eliminación específica de células de tumor.

10 A partir de las variaciones y realizaciones ejemplificativas descritas, estará claro para una persona experta en la materia que el principio inventivo descrito arriba no solamente puede utilizarse para la identificación/eliminación altamente específica de células de tumor o de células receptoras malignas restantes después de un trasplante de célula, sino que también para la identificación/eliminación de cualquier otro tipo celular que lleva una combinación específica de dos antígenos que la distingue de otros tipos de células.

15 A continuación, se hace referencia a las figuras:

La Figura 1 muestra el principio de la invención. Figura 1A: Antígenos y diseño de polipéptidos P1 y P2. Figura 1B: Si una célula expresa ambos antígenos 1 y 2 en su superficie celular, la unión simultánea de polipéptido P1 y polipéptido P2 a la superficie de esta célula acerca P1 y P2, causa la asociación de fragmentos F1 y F2 y restauración de la función biológica de dominio F por complementación. No ocurre restauración de función biológica si solamente el antígeno A1 (Figura 1C) o antígeno A2 (Figura 1D) está presente en la superficie celular.

20 La Figura 2 muestra una realización ejemplificativa de la invención en un escenario de trasplante alogénico para neoplasias hematopoyéticas con antígenos HLA incompatibles. En esta situación, la información dual del haplotipo HLA receptor (HLA<sub>paciente</sub>) y origen de linaje hematopoyético (CD45) se despliega exclusivamente en blastocitos leucémicos y otras células hematopoyéticas del paciente. El primer polipéptido P1 comprende una construcción de anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla dirigida contra HLA del paciente (porción dirigida T1) fusionada al fragmento V<sub>L</sub> de anti CD3 (fragmento F1). El segundo polipéptido P2 comprende una construcción de fragmento variable de cadena sencilla específica para el marcador de linaje hematopoyético CD45 (porción dirigida T2), fusionada al fragmento de división V<sub>H</sub> de Fv anti CD3 (fragmento F2).

25 CD45: antígeno específico para células hematopoyéticas. HLA<sub>paciente</sub>: HLA-antígeno específico para células del paciente, es decir, una variante alélica de MHC de humano que está presente en la superficie de células de paciente (=células del receptor de trasplante de célula), pero ausente de la surface de células donantes. scFv  $\alpha$ CD45: scFv con especificidad de unión para CD45. scFv  $\alpha$ HLA<sub>paciente</sub>: scFv con especificidad de unión para paciente HLA. CD3(V<sub>H</sub>): región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo con especificidad de unión para CD3. CD3(V<sub>L</sub>): región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo con especificidad de unión para CD3.

30 En la unión de las dos construcciones a través de sus scFv  $\alpha$ CD45 y scFv  $\alpha$ HLA<sub>paciente</sub>, respectivamente, a una célula que lleva tanto CD45 y el antígeno HLA<sub>paciente</sub>, ensamble de CD3(V<sub>H</sub>) con CD3(V<sub>L</sub>) conduce a complementación funcional del anticuerpo con especificidad de unión para CD3, de esta manera, permitiendo el reclutamiento específico y activación de células T a través de las moléculas CD3 en su superficie celular.

35 La Figura 3 muestra las construcciones utilizadas en los experimentos representados en las Figuras 4-9. (Construcción 85 difiere de la construcción 71 por el hecho de que la construcción 85 tiene una etiqueta FLAG mientras la construcción 71 tiene una etiqueta myc. Construcción 75 difiere de la construcción 82 por el hecho de que la construcción 75 tiene una etiqueta FLAG mientras la construcción 82 tiene una etiqueta myc) V<sub>H</sub>CD3: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3; V<sub>L</sub>CD3: región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3; V<sub>H</sub>A2: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-HLA-A2; V<sub>L</sub>A2: región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-HLA-A2; V<sub>L</sub>45: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD45; V<sub>H</sub>45: región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD45; L18, L7, L15, L6, L19: conector de 18, 7, 15, 6, 19 aminoácidos, respectivamente.

40 La Figura 4 muestra construcciones scFv de cadena sencilla biespecíficas aleatorias, convencionales utilizadas para controlar el sistema de ensayo. Brevemente, las construcciones de anticuerpos biespecíficas con especificidad para CD3 y HLA A2 se concentraron como se indica en un co-cultivo de U266, una estirpe de mieloma positiva CD45, una positiva HLA A2, y células T negativas HLA A2 (células mononucleares de sangre periférica eliminada de monocito), y se determinó la producción de interleucina 2 por células T. La capacidad estimuladora de célula T sustancial se detectó para las dos construcciones 85 y 71 FvCD3-HLA-A2, que difieren por sus etiquetas respectivas FLAG o Myc (Para estructura de dominio de construcciones véase Figura 3). Las construcciones Fv aleatorias biespecíficas en la configuración HLA-A2-CD3 fueron menos eficientes y las construcciones de cadena sencilla que dirigen ya sea HLA-A2 o CD3 no estimularon del todo las células T. El control positivo se conduce utilizando estimulación no específica de PHA-L (fitohemaglutinina).

45 La Figura 5 muestra capacidad estimuladora de célula T altamente específica y exquisita si se utiliza un par de construcciones de complementación de acuerdo con la invención, pero no si se utiliza solamente una de las dos construcciones de un par de manera individual. Brevemente, V<sub>L</sub>CD3-scFvHLA-A2 (construcción 42), V<sub>H</sub>CD3-

scFvCD45(V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) (construcción 45) y V<sub>H</sub>CD3-scFvCD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) (construcción 55) se concentraron por separado o en las combinaciones de construcciones 42 y 45, o 42 y 55 para co-cultivos de U266 y células T como se describe. La alta capacidad estimuladora de la célula T se demostró para las combinaciones de 42/45 o 42/55 con actividad minuta, si solamente una de estas construcciones se da por separado. Estos resultados muestran que los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de FvCD3 tienen que cooperar para reconstituir o complementar la función que emplea la célula T. De manera importante, la porción dirigida scFvCD45 podría cambiarse de la configuración (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) a (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), indicando claramente que el carácter modular de las construcciones permite el reemplazo de un resto diana por otra porción dirigida con especificidad deseada. El sistema de ensayo se controló por el uso de construcciones de cadena sencilla CD45 (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) y CD45 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) que no estimularon células T para producir IL2.

Figura 6 muestra un primero de tres experimentos de bloqueo competitivos. La construcción aleatoria biespecífica FvCD3-HLA-A2 (construcción 71) se da a co-cultivos de U266 y células T como se describe y la función estimuladora se determinó a través de la producción de IL2 inducida por linfocitos T. La función que estimula la célula T se bloqueó por construcciones de cadena sencilla que ocupan el epítipo dirigido en la Molécula HLA A2 (construcción 4, concentración \*100). Se reguló la estimulación intrínseca de células T por las construcciones de cadena sencilla específicas HLA A2 o CD3 (construcción 4 (concentración \*100) o construcción 36 (concentración \*9)). PHA-L se utilizó como control positivo.

La Figura 7 muestra que las "construcciones tridominio" (es decir, construcciones de acuerdo con la invención) primero tienen que unirse en la superficie de una sola célula para dimerizar y complementar las funciones que emplean célula T de los experimentos de bloqueo de epítipo competitivo. Brevemente, las construcciones 42 y 45 se dan a co-cultivos de células U266 y linfocitos T negativos HLA-A2 y la capacidad estimuladora se determinó por producción de IL2 de células T. En situaciones experimentales donde los epítopos en las moléculas HLA A2 o CD45 se bloquean competitivamente por construcciones 4 o 46 (ambas concentraciones \*100), se anula la función estimuladora de célula T. Estos resultados claramente indican que las dos "construcciones tridominio" respectivas tienen que unirse simultáneamente sobre la superficie de una célula para restaurar o complementar la función que emplea célula T. La actividad estimuladora intrínseca de cualquier construcción (42, 45, 4, 46 y 36) se reguló utilizando concentraciones diferentes.

La Figura 8 muestra el experimento análogo a la Figura 7 para la combinación de construcciones 42 y 55. De nuevo, capacidad estimuladora de célula T de la combinación de las dos "construcciones tridominio" se derogó por bloqueo competitivo de epítopos antigénicos en la molécula HLA A2 o CD45. De manera importante, estos resultados de nuevo muestran que el módulo dirigido puede reemplazarse fácilmente por otro módulo con especificidad apropiada. De manera más importante, la configuración V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> de construcción 42 y la configuración V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> de construcción 55 impide la homo- o hetero-dimerización o auto-ensamble de las construcciones sin unión anterior a un sustrato que expresa ambos antígenos, HLA A2 y CD45.

La Figura 9 muestra lisis de células U266 por células T negativas HLA A2 en una muestra que comprende ambas construcciones, V<sub>L</sub>CD3-scFvHLA-A2 y V<sub>H</sub>CD3-scFvCD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) ("ambas construcciones"). No se observó lisis significativa en muestras de control que comprenden solamente una de las dos construcciones.

La Figura 10 muestra la restauración *in vivo* de los polipéptidos. La unión de dos polipéptidos separados (P1 y P2) a sus antígenos respectivos en una célula dirigida, consistiendo cada uno de un fragmento de anticuerpo variable de cadena sencilla específico (scFv, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) fusionado al dominio de cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) o cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) de un anticuerpo específico CD3 (Fragmento F1 y F2), permite la heterodimerización V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> y la formación de un sitio de unión CD3 funcional para emplear células T.

La Figura 11 muestra que la dimerización V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> de CD3 emplea células T y es antígeno dual restringido. Mieloma U266, leucemia pro-linfocítica de célula T primaria (T-PLL), y células de leucemia mieloide aguda THP-1, todas HLA-A2 positivas y CD45 positivas, se probaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) donantes HLA-A2 negativas y los polipéptidos como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción (Fig.11A) de interleucina-2 (IL-2) y lisis de célula dirigida (Fig.11B). El anticuerpo scFv (CD3(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) - HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) aleatorio, biespecífico se utilizó como un control positivo. (Fig.11C), la unión de los polipéptidos en células THP-1 se bloquea competitivamente por un exceso de inhibidores scFvCD45 (izquierda) y scFvHLA-A2 (derecha) (bloqueando los epítopos de antígeno individuales en la célula dirigida)), como se indica, y se investigó la producción reactiva de IL2 por PBMC donantes. (Fig.11D), las estirpes negativas de antígeno sencillo o doble, RAJI y KMS-12-BM, se probaron con los polipéptidos. PHA-L se utilizó como un control de estímulo no específico para PBMC.

La Figura 12 muestra terapia dirigida por complementación condicional V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> CD3 *in vivo*. (Fig.12A), Supervivencia de ratones (n = 6 por grupo) después de inyección intraperitoneal de 5×10<sup>6</sup> células leucémicas agudas THP-1 junto con 1.25 × 10<sup>5</sup> células T donantes HLA-A2 negativas, específicas de CMV y los polipéptidos (0.5 µg) como se indica (proporción de células de tumor:célula T = 40/1). (Fig.12B), activación de caspasa 3 se valoró *in vitro* por citometría de flujo en células espectadoras HLA-A2/CD45 doble positivas, THP-1 y CD45 positivas pero HLA-A2 negativas después de co-cultivo con células T donantes y los polipéptidos (3 nM) como se indica. El anticuerpo scFv (CD3(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) - HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) aleatorio biespecifico se utilizó como un control positivo.

5 La Figura 13 muestra que los polipéptidos EGFR- y EpCAM-dirigidos emplean células T para destrucción de la célula de carcinoma. La estirpe de cáncer de colon humano EGFR y EpCAM doble positivas, Colo-206F, y estirpe de melanoma FM-55 (EGFR-positiva pero EpCAM-negativa) se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para EGFR (CD3(V<sub>H</sub>)-EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y EpCAM (CD3(V<sub>L</sub>)-EpCAM(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción (A) de interferón- $\gamma$  reactivo (IFN $\gamma$ ) y activación de caspasa 3 en células dirigidas (B).

10 La Figura 14 muestra que los polipéptidos HLA-A2 y CEA dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpe de cáncer de colon de humano, Colo-206F, estirpe de melanoma FM-55 y estirpe de cáncer ovárico OVCAR se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y CEA (CD3(V<sub>H</sub>)-CEA(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

15 La Figura 15 muestra que los polipéptidos HLA-A2 y EGFR dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpes de Colo-206F, FM-55 y OVCAR de humano se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y EGFR (CD3(V<sub>H</sub>)-EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

20 La Figura 16 muestra que los polipéptidos HLA-A2 y Her2 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpes Colo-206F, FM-55 y OVCAR de humano se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y Her2 (CD3(V<sub>H</sub>)-Her2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

25 La Figura 17 muestra que los polipéptidos CD45 y HLA-A2 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. En este experimento se intercambiaron los fragmentos antiCD3 de división (CD3(V<sub>H</sub>) y CD3(V<sub>L</sub>)) para las porciones dirigidas anti-CD45 y anti-HLA-A2, en comparación con los polipéptidos CD45 y HLA-A2 utilizados en las Figs. 5, 7-9, 11, 12, 14-16. Estirpe de mieloma de humano U266 se probó con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para CD45 (CD3(V<sub>L</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-A2 (CD3(V<sub>H</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

30 La Figura 18 muestra que los polipéptidos EGFR y EpCAM dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpes de cáncer de colon de humano Colo-206F y CX-1 y estirpe de cáncer ovárico OVCAR se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para EpCAM (CD3(V<sub>L</sub>)-EpCAM(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y EGFR (CD3(V<sub>H</sub>)-EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

35 La Figura 19 muestra que los polipéptidos Her2 y EpCAM dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpe de cáncer ovárico de humano OVCAR se probó con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para EpCAM (CD3(V<sub>L</sub>)-EpCAM(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y Her2 (CD3(V<sub>H</sub>)-Her2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

40 La Figura 20 muestra que los polipéptidos CD45 y CD138 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpe de mieloma de humano AMO-1 se probó con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para CD45 (CD3(V<sub>L</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) panel superior, CD3(V<sub>H</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) panel inferior) y CD138 (CD3(V<sub>H</sub>)-CD138(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) panel superior, CD3(V<sub>L</sub>)-CD138(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) panel inferior) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

45 La Figura 21 muestra que el direccionamiento de un antígeno sencillo (CD138) con polipéptidos CD138 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpe de mieloma de humano AMO-1 se probó con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para CD138 (CD3(V<sub>L</sub>)-CD138(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) y (CD3(V<sub>H</sub>)-CD138(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

50 La Figura 22 muestra que el direccionamiento de un antígeno sencillo (CD45) con polipéptidos CD45 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de célula de tumor. Estirpes de mieloma de humano AMO-1 y U266 se probaron con PBMC en la presencia de polipéptidos específicos para CD45 (CD3(V<sub>L</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) y (CD3(V<sub>H</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

55 La Figura 23 muestra la restauración En diana de dos polipéptidos dirigidos contra un antígeno sencillo en la superficie celular, direccionando dos epítopos diferentes (parte superior) o el mismo epítipo (parte inferior) en el antígeno. La unión de dos polipéptidos separados (P1 y P2) a su epítipo respectivo, en el mismo antígeno, en una célula dirigida. Para direccionamiento de dos epítopos diferentes, la porción dirigida de cada polipéptido consiste en un fragmento de anticuerpo variable de cadena sencilla específico (scFv). Para direccionamiento del mismo epítipo,

la porción dirigida de cada polipéptido consiste en el mismo fragmento de anticuerpo variable de cadena sencilla (scFv). Las porciones dirigidas se fusionan a través de conectores de péptido al dominio de cadena ligera variable ( $V_L$ ) o cadena pesada variable ( $V_H$ ) de un anticuerpo específico CD3 (Fragmento F1 y F2), permite la heterodimerización de  $V_H/V_L$  y la formación de un sitio de unión CD3 funcional (dominio funcional) para emplear células T.

La Figura 24 muestra la posibilidad de utilizar diferentes maneras efectoras para matar una célula dirigida con un kit de partes de polipéptido. Para este fin, el módulo anti-CD3 (F1 y F2) se reemplaza por un módulo anti-His (hexa-histidina) que, después de la unión simultánea de polipéptido 1 y 2, complementa un sitio de unión de hexa-histidina y de esta manera une las cargas marcadas con histidina (por ejemplo, una toxina marcada con HIS). La porción dirigida T1 ( $V_H-V_L$ ) de polipéptido P1 se une específicamente a HLA-A2, la porción dirigida T2 ( $V_H-V_L$ ) de polipéptido P2 se une específicamente a CD45. El fragmento F1 de polipéptido P1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo contra una etiqueta de hexahistidina y fragmento F2 de polipéptido P2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo. Estirpe de leucemia mieloide de humano THP-1 se probó con un componente de toxina Iota, la, de *Clostridium perfringens* etiquetado con histidina (His) a 0.01  $\mu\text{g/ml}$  en combinación con polipéptidos indicados. Después de 48 horas en cultivo, se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo alamarBlue®. Los resultados muestran una reducción de viabilidad contra los antecedentes del ensayo para células probadas con la combinación, pero no con polipéptidos individuales. Las células THP-1 control se desarrollaron simultáneamente en cultivo sin toxina. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

La Figura 25 muestra que los polipéptidos HLA-A2 y CD45 dirigidos, que comprenden un anticuerpo de división contra una etiqueta His, matan células de tumor utilizando una subunidad A de toxina Shigga etiquetada con histidina (His) a una concentración de 0.01  $\mu\text{g/ml}$ . Se utilizó la misma disposición experimental como en la Figura 24.

La Figura 26 muestra que los polipéptidos HLA-A2 y CD45 dirigidos, que comprenden un anticuerpo de división contra una etiqueta His, matan células de tumor utilizando una subunidad A de toxina Shigga etiquetada con histidina (His) a una concentración de 0.01  $\mu\text{g/ml}$ . Se utilizó la misma disposición experimental como en la Figura 24-Figura 25.

La Figura 27 muestra que los polipéptidos EGFR y EpCAM dirigidos, que comprenden un dominio funcional F con F1 y F2 son  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo específico para digoxigenina (aDig), marcar células de tumor utilizando una molécula de peroxidasa de rábano picante (HRP) marcada con digoxigenina. La porción dirigida T1 ( $V_H-V_L$ ) de polipéptido P1 se une específicamente a EGFR, la porción dirigida T2 ( $V_H-V_L$ ) de polipéptido P2 se une específicamente a EpCAM. El fragmento F1 de polipéptido P1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo contra digoxigenina y fragmento F2 de polipéptido P2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo. Estirpe de cáncer de colon de humano Colo-206F se probó primero con polipéptidos indicados seguidos por prueba con HRP marcada con digoxigenina. Las muestras se analizaron utilizando el Kit ELISA Invitrogen™ y la absorbencia se leyó con un lector de microplaca BioRAD. Para análisis, la muestra en blanco de cromógeno (no Digoxigenin-HRP) se fijó en 0. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

La Figura 28 muestra que los polipéptidos CD45 y HLA-Cw6 dirigidos, redirigen las células T para destrucción de células del paciente. Se utilizaron las células de paciente primarias con haplotipos HLA conocidos. A51 = células de un paciente con MDS (síndrome mielodisplástico), homocigotas para el haplotipo HLA-Cw6. A49 = células de un paciente después de trasplante alogénico de médula ósea, heterocigotas para el haplotipo HLA-Cw6. Las células del paciente se incubaron con PBMC sanas por 30 horas, en la presencia de polipéptidos específicos para CD45 ( $\text{CD3}(V_L)\text{-CD45}(V_H-V_L)$ ) y HLA-Cw6 ( $\text{CD3}(V_H)\text{-HLA-CW6}(V_H-V_L)$ ) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de  $\text{IFN}\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

La Figura 29 muestra que los polipéptidos EGFR y EpCAM dirigidos, redirigen las células T para destrucción de las células del paciente de cáncer primario. Células de tumor A44 se recolectaron de ascitis maligna de un paciente hombre de 48 años de edad con cáncer pancreático metastático. Las células de tumor del paciente se incubaron con PBMC propias del paciente (recolectadas por flebotomía) por 30 horas, en la presencia de polipéptidos específicos para EpCAM ( $\text{CD3}(V_L)\text{-EpCAM}(V_H-V_L)$ ) y EGFR ( $\text{CD3}(V_H)\text{-EGFR}(V_H-V_L)$ ) como se indica. El empleo de célula T se valoró por producción de  $\text{IFN}\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

La Figura 30 muestra que los polipéptidos CD45 y HLA-A2 dirigidos, redirigen células T  $\text{CD8}^+$  restringidas a CMV para destrucción de célula de tumor. Las células de tumor de humano THP-1 y U266 se incubaron con células T restringidas a CMV de un donante sano HLA-A2 negativo por 30 horas, en la presencia de polipéptidos específicos para HLA-A2 ( $\text{CD3}(V_L)\text{-HLA-A2}(V_H-V_L)$ ) y CD45 ( $\text{CD3}(V_H)\text{-CD45}(V_H-V_L)$ ) como se indica. El anticuerpo scFv aleatorio biespecífico ( $\text{CD3}(V_H-V_L) \times \text{HLA-A2}(V_H-V_L)$ ) se utilizó como un control positivo. El empleo de célula T se valoró por producción de  $\text{IFN}\gamma$  reactiva. Las muestras se corren y analizan como duplicados.

Figura 31 muestra la idea principal de eliminar el trastorno de hipersensibilidad o autoinmune causando clones de célula B con un kit de partes de polipéptido, consistiendo de un polipéptido específico de alérgeno y un polipéptido específico de tipo de célula. El primer polipéptido P1 tiene en su porción dirigida un alérgeno (por ejemplo, Betv-1A, Der-f2, Conglutin-7, Can-f1, Feld-d1). El segundo polipéptido P2 tiene en su porción dirigida un fragmento de



anticuerpo variable de cadena sencilla específico (scFv,  $V_H$ - $V_L$ ) dirigiendo una proteína de superficie celular (por ejemplo, CD19, CD138, CD38). Ambas porciones dirigidas se fusionan ya sea al dominio de cadena ligera variable ( $V_L$ ) o cadena pesada variable ( $V_H$ ) de un anticuerpo específico CD3 (Fragmento F1 y F2).

- 5 A continuación se hace referencia a ciertos genes (humanos) o proteínas también referidas en la especificación, los ejemplos anexos y figuras también (parcialmente) en las reivindicaciones. Aquí abajo, se proporcionan los números de acceso de gen correspondientes (ejemplificativos). Los números de acceso adicionales también se proporcionan en la especificación en cualquier parte en el presente documento así como los ejemplos anexos.
- 10 **CD45:** ID de Gen: 5788, actualizada el 13 de Enero de 2013, 3. Proteína = P08575-1 = Isoforma 1, Modificada por última vez 19 de Julio de 2003. Versión 2  
**CD34:** Proteína: P28906-1/2 Modificada por última vez el 15 de Julio de 1998. Versión 2.  
**CD33:** ID de Gen: 945, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; Proteína: P20138 [UniParc]. Modificada por última vez el 17 de Octubre de 2006. Versión 2. Suma de verificación: 1C73E588240FBAD8
- 15 **CD138:** ID de Gen: 6382, actualizada el 6 de Enero de 2013, 4. Proteína = P18827 [UniParc]. Modificada por última vez el 5 de Mayo de 2009. Versión 3.  
**CD15:** ID de Gen: 2526, actualizada el 5 de Enero de 2013  
**CD1a:** ID de Gen: 909, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, P06126 [UniParc]. Modificada por última vez el 9 de Febrero de 2010. Versión 4. Suma de verificación: C575C3C538F0AA29
- 20 **CD2:** ID de Gen: 914, actualizada el 5 de Enero de 2013; P06729 [UniParc]. Modificada por última vez el 23 de Octubre de 2007. Versión 2. Suma de verificación: A03D853C3B618917  
**CD3e:** ID de Gen: 916, actualizada el 5 de Enero de 2013, P07766 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Febrero de 1996. Versión 2. Suma de verificación: A1603D01CE9957D7  
**CD4:** ID de Gen: 920, actualizada el 13 de Enero de 2013; P01730 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Noviembre de 1988. Versión 1. Suma de verificación: 20ED893F9E56D236
- 25 **CD5:** ID de Gen: 921, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; P06127 [UniParc]. Modificada por última vez el 30 de Noviembre de 2010. Versión 2. Suma de verificación: 9131AEC9683EE1D3  
**CD8a:** ID de Gen: 925, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; Isoforma 1/2 (membrana) P01732-1/2 (mCD8alfa) [UniParc]. Modificada por última vez el 21 de Julio 1986. Versión 1. Suma de verificación: FCCA29BAA73726BB
- 30 **CD20:** ID de Gen: 931, actualizada el 6 de Enero de 2013; P11836 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Octubre de 1989. Versión 1. Suma de verificación: AC5420F8B626BDD1  
**CD23:** ID de Gen: 2208, actualizada el 4 de Enero de 2013; P06734 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Enero de 1988. Versión 1. Suma de verificación: F86708C0E6515B87
- 35 **CD31:** ID de Gen: 5175, actualizada el 13 de Enero de 2013; Isoforma Larga [UniParc]. Modificada por última vez 1 de Abril de 1990. Versión 1. Suma de verificación: C57BBFA200A407A6, P16284-1/2/3/4/5/6 = Isoformas 1-6  
**CD43:** ID de Gen: 6693, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; P16150 [UniParc]. Modificada por última vez 1 de Abril de 1990. Versión 1. Suma de verificación: C9C9AB8435D5E1FE
- 40 **CD56:** ID de Gen: 4684, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; Isoforma 1 [UniParc]. Modificada por última vez el 22 de Julio de 2008. Versión 3. Suma de verificación: FD3B9DE80D802554, P13591-2/1/3/4/4/6, Isoformas 1-6  
**CD57:** ID de Gen: 27087, actualizada el 5 de Enero de 2013  
**CD68:** ID de Gen: 968, actualizada el 6 de Enero de 2013; Isoforma Larga (CD68.1) [UniParc]. Modificada por última vez el 15 de Mayo de 2007. Versión 2. Suma de verificación: 69E68D69EDE8EFB0, P34810-1/2, Isoforma 1/2
- 45 **CD79a:** ID de Gen: 973, actualizada el 5 de Enero de 2013; Isoforma 1 (Larga) [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Junio de 1994. Versión 2. , Suma de verificación: 6E5B837409969292, P11912-1/2, Isoforma 1/2
- 50 **CD146:** ID de Gen: 4162, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; Isoforma 1 [UniParc]. Modificada por última vez el 10 de Enero de 2006. Versión 2. Suma de verificación: E46CB8AC7BA0738E, P43121-1/2, Isoforma 1/2.

**proteínas de agente tensioactivo (A y B):**

- 55 ID de Gen: 6440, actualizada el 30 de Diciembre de 2012 e ID de Gen: 6439, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, P07988 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Mayo de 1992. Versión 3. Suma de verificación: 9FD7F66678A35153, e Isoforma 1 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Abril de 1990. Versión 2. Suma de verificación: C26A21E33C60AA78, P11686-1/2, Isoforma 1/2

**sinaptofisina:**

- 60 ID de Gen: 6855, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, P08247 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Agosto de 1991. Versión 3. Suma de verificación: 592289C43B12EFA7

**receptores de acetilcolina nicotínica:**

- ID de Gen: 1138, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, ID de Gen: 1136, actualizada el 6 de Enero de 2013, ID de Gen: 1139, actualizada el 13 de Enero de 2013, ID de Gen: 1137, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, ID de Gen: 1141, actualizada el 5 de Enero de 2013

65 **quinasa específica muscular MUSK:**

- ID de Gen: 4593, actualizada el 8 de Enero de 2013, Isoforma 1 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de

Enero de 1998. Versión 1. Suma de verificación: 3DDC20E179FA010C, O15146-1/2, Isoforma 1/2

**canal de calcio dependiente de voltaje (tipo P/Q):**

ID de Gen: 773, actualizada el 5 de Enero de 2013; Isoforma 1 (1A-1) (BI-1-GGCAG) [UniParc]. Modificada por última vez el 15 de Julio de 1999. Versión 2. Suma de verificación: 2F2F378ACE02FD56, O00555-1/2/3/4/5/6/7, Isoformas 1-7, ID de Gen: 25398, actualizada el 11 de Enero de 2013, J3KP41 [UniParc]. Modificada por última vez el 3 de Octubre de 2012. Versión 1. Suma de verificación: AEDF4D2A5E49263F

**canal de potasio dependiente de voltaje (VGKC):**

ID de Gen: 3737, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, ID de Gen: 3736, actualizada el 8 de Enero de 2013, ID de Gen: 3742, actualizada el 8 de Enero de 2013

**receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA):**

ID de Gen: 2904, actualizada el 5 de Enero de 2013, Q13224 [UniParc]. Modificada por última vez el 20 de Junio de 2001. Versión 3. Suma de verificación: 40AEB12BE6E50CEF; ID de Gen: 2902, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, Isoforma 3 (Larga) (NR1-3) [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Junio de 1994. Versión 1. Suma de verificación: CDF5402769E530AB, Q05586-1/2/3/4/5, Isoformas 1-5

**TSHR:** ID de Gen: 7253, actualizada el 4 de Enero de 2013, Isoforma Larga [UniParc]. Modificada por última vez el 29 de Marzo de 2005. Versión 2. Suma de verificación: D2EE9CEBFD64A65F, P16473-1/2/3, Isoformas 1-3

**Anfifisina:**

ID de Gen: 273, actualizada el 8 de Enero de 2013, Isoforma 1 (128 kDa) [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Febrero de 1996. Versión 1., Suma de verificación: 78B4F75AB75BA357, P49418-1/2, Isoforma 1-2

**gangliósido GQ1B:** ID de Gen: 29906, actualizada el 30 de Diciembre de 2012

**GD3:** ID de Gen: 117189, actualizada el 22 de Junio de 2012

**Ca-125:** ID de Gen: 94025, actualizada el 30 de Diciembre de 2012, Q8WXI7 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Marzo de 2003. Versión 2. Suma de verificación: B3E7BDF19997A440

**Her-2/neu:** ID de Gen: 2064, actualizada el 13 de Enero de 2013, 4. Proteína = P04626-1/2/3/4 = Isoforma 1-4, Modificada por última vez el 13 de Agosto de 1987. Versión 1.

Proteína de fluido de enfermedad quística densa 15; ID de Gen: 5304, actualizada el 30 de Diciembre de 2012

**CD117:** ID de Gen: 3815, actualizada el 6 de Enero de 2013

**CD30:** ID de Gen: 943, actualizada el 6 de Enero de 2013; Isoforma Larga [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Diciembre de 1992. Versión 1. Suma de verificación: 7A407CC78A6E0BC8, P28908-1/2, Isoforma 1/2

**Receptor del factor de crecimiento derivado de Plaqueta PDGFR alfa:**

ID de Gen: 5159, actualizada el 13 de Enero de 2013, ID de Gen: 5156, actualizada el 13 de Enero de 2013, Isoforma 1 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Abril de 1990. Versión 1. Suma de verificación: 5E3FB9940ACD1BE8, P16234-1/2/3, Isoformas 1-3; P09619 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Julio de 1989. Versión 1. Suma de verificación: 038C15E531D6E89D

**Marcador asociado con Melanoma/Mart 1:**

ID de Gen: 2315, actualizada el 30 de Diciembre de 2012; Q16655 [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Noviembre de 1996. Versión 1. Suma de verificación: B755BFF39CFB16E

**CD133:** ID de Gen: 8842, actualizada el 13 de Enero de 2013; Isoforma 1 (AC133-1) (S2) [UniParc]. Modificada por última vez el 1 de Junio de 1998. Versión 1. Suma de verificación: D21CBC05ADB2DEDF, O43490-1/2/3/4/5/6/7, Isoformas 1-7

A continuación se hace referencia a los ejemplos que se dan para ilustrar, no limitar la presente invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

**Clonación de construcciones de anticuerpo recombinante**

Las secuencias de ADN derivadas de células de hibridoma y codificación de los dominios variables de anticuerpos anti-CD3, anti-CD45 y anti-HLA A2, respectivamente, se utilizaron para generar las construcciones de anticuerpo representadas en la Figura 3A-3B por métodos convencional de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Las construcciones se diseñan para llevar diferentes etiquetas de afinidad para facilitar la identificación y purificación en la expresión de proteínas recombinantes (etiqueta Myc, FLAG, His). Para detalles en el orden del dominio, las etiquetas de afinidad y conectores de las construcciones, véase Figura 3A-3B.

La secuencia líder pelB para una secuencia de aminoácidos que dirige una proteína expresada en bacterias al periplasma bacteriano. La secuencia líder se segmenta por enzimas bacterianas y puede aislarse la proteína.

**Ejemplo 2**

**Expresión y Purificación de Anticuerpos Recombinantes**

Expresión de Proteína Periplásmica:

Las construcciones de anticuerpo recombinante se expresaron en el periplasma de cepa TG1 de *E. coli* utilizando un vector de expresión procariótica apropiado. Dos litros de medio 2 × TY incluyendo 0.1 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina se inocularon con 20 ml de un cultivo durante la noche de TG1 transformado y se desarrollaron a fase exponencial (OD<sub>600</sub> 0.8 – 0.9) a 37 °C. Ya que los fragmentos de anticuerpo están bajo control del promotor de lactosa, la expresión de proteína se indujo por adición de 1 mM IPTG seguido por incubación a RT (temperatura ambiente) con agitación por 3 horas más. Las células se recolectaron mediante centrifugación por 10 minutos a 2,750 × g y 4 °C y se resuspendieron en 100 ml o un tampón apropiado. La lisis celular se realizó al añadir 50 µg/ml de lisozima recientemente disuelta [Roche Diagnostics] e incubar por 25 minutos en hielo. Después, se añadieron 10 mM de MgSO<sub>4</sub> para estabilizar los esferoplastos, y las células se centrifugaron por 10 minutos a 6,200 × g y 4 °C. Finalmente, el sobrenadante obtenido, que contiene la proteína periplásmica, se dializó contra PBS durante la noche a 4 °C y se centrifugó de nuevo por 15 minutos como se estableció arriba. Después, las proteínas recombinantes se purificaron por Ni-NTA-IMAC (Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado por ácido Níquel Nitrilo-triacético).

Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC):

Para purificación de proteínas recombinantes con una etiqueta His<sub>6</sub>, se realizó IMAC por medio de perlas de agarosa de ácido níquel-nitrilotriacético (NTA) inmovilizada [Qiagen]. Primero, una columna de 1 ml de agarosa Ni-NTA necesaria para equilibrarse con aproximadamente 10 ml de PBS estéril o una solución de tampón fosfato sódico con 20 mM de imidazol. Después, la proteína cruda, ya sea precipitada de expresión citoplásmica o dializada de la expresión periplásmica, se aplicó gradualmente a la columna. Después de enjuagar con aproximadamente 20 ml de un tampón de enjuague IMAC apropiado (solución tampón fosfato sódico que contiene 20 – 35 mM de imidazol) hasta que ya no fue detectable más proteína en el flujo, la proteína unida se eluyó de la columna en 500 µl de fracciones con una solución tampón fosfato sódico incluyendo 250 mM de imidazol.

Todas las fracciones de elución y enjuague recolectadas se probaron por la presencia de proteína por un ensayo Bradford cualitativo al añadir 10 µl de cada muestra a 90 µl de 1 × solución Bradford. La verificación del proceso de purificación se realizó por un análisis SDS-PAGE. Para este propósito, las fracciones eluidas se corren en paralelo con proteína cruda, flujo, y la fracción de enjuague bajo condiciones reductoras. Finalmente, las fracciones positivas determinadas por la reacción colorimétrica se agrupan en fracciones, máxima y menor, y dializan contra PBS durante la noche a 4 °C. Para uso en ensayo de estimulación, se han determinado las proteínas purificadas necesarias para filtrarse estériles, y su concentración. Además, después de la cuantificación de proteína, 2 µg de fracciones utilizadas adicionales también se analizan por SDS-PAGE y Western blotting bajo condiciones reductoras y no reductoras.

En una alternativa del Ejemplo 2, se sintetizó la codificación de ADN para (V<sub>H</sub>)CD3-EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)CD3-CEA(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)CD3-Her2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)CD3-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)CD3-HLA-CW6(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)CD3-CD138(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)antiDig-EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>H</sub>)antiHis-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>L</sub>)CD3-CEA(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>L</sub>)CD3-EpCAM(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>L</sub>)antiDig-EpCAM(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>L</sub>)antiHis-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>), (V<sub>L</sub>)CD3-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) y se produjeron proteínas y se aislaron por GenScript (Piscataway, NJ, USA). El ADN se optimizó por codón para expresión de *E. coli* (vector E3), optimizó por expresión, desarrolló en 2 litros de medio LB convencional, se obtuvo proteína de los cuerpos de inclusión o periplasma (pelB líder) en un paso por la columna Ni-HiTrap. Las endotoxinas bacterianas se remueven por diálisis contra 5 litros de 1x tampón fosfato salino (PBS). La concentración se midió por ensayo de proteína Bradford con albúmina de suero de bovino (BSA) como convencional. La pureza se estimó por análisis densitométrico de un gel SDS-PAGE coloreado con Azul Coomassie. Las alícuotas se almacenan a -80 °C o +4 °C. Se utilizó el tampón de almacenamiento 1xPBS, 5 % de Glicerol, 0.5 % de sarcosina lauroil de sodio, pH 7.4.

### **Ejemplo 3**

#### **Técnicas de Cultivo Celular**

Cultivo Celular:

Las células de mamífero se cultivaron en matraces de cultivo de tejido T75 en 20 ml del medio de cultivo apropiado a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>. Las células se dividen cada 2-3 días. Las células adherentes primero necesitan separarse con 1 × tripsina-EDTA. Las células se cuentan utilizando un colorante vital, eosina o tripán azul. Para almacenamiento, las células de 60-80 % de confluencia se recolectan por centrifugación por 5 minutos a 450 × g, resuspenden en FCS con 10 % DMSO, se dividen en alícuotas en criofrascos, y se congelan gradualmente a una temperatura de -80 °C. Las células se descongelaron rápidamente a 37 °C en un baño de agua y se añadieron cuidadosamente 5 ml de medio. Para remover DMSO, las células se centrifugaron de nuevo, resuspendieron en medio fresco y transfirieron en un matraz de cultivo de tejido.

Preparación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC):

PBMC, comprendiendo linfocitos y monocitos, se aislaron previamente de la capa leucocitaria de un donante humano sano por centrifugación de densidad utilizando la solución de separación de linfocito a base de Ficoll LSM 1077 (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Ya que, durante uso, estas PBMC aparecieron sin embargo como

población celular inhomogénea, la separación de los eritrocitos, granulocitos, y trombocitos restantes se repite como sigue. PBMC descongeladas, resuspendidas en 30 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 10 % FCS y Pen-Strep, se colocaron en capas cuidadosamente sobre 10 ml de LSM 1077 y se centrifugaron por 5 minutos a  $800 \times g$  sin rompimiento. Después de descartar la fase superior, PBMC concentradas en la interfase se transfieren hacia un tubo fresco, resuspenden en 30 ml de medio, y centrifugan por 5 minutos a  $450 \times g$ . Los monocitos se retiran al cultivar PBMC en una placa de cultivo de tejido de 10 cm Ø durante la noche, permitiendo la adherencia de monocitos a la placa. Finalmente, se recolectan PBMC restantes en solución.

En una alternativa del Ejemplo 3, células de cáncer de humano primarias de un paciente con cáncer pancreático metastático se extraen de las bolsas de ascitis del paciente (Figura 29). 4 litros con ascitis maligna recolectada fresca se almacenan en botellas de vidrio de 2 litros a 4 °C durante la noche. El siguiente día, la bolita celular de la parte inferior de vidrio se enjuagó en 1xPBS y resuspendió en medio de cultivo (DMED complementado con 200 µM de l-glutamina, 10 % de FBS activado por calor, penicilina (200 U/mL), estreptomicina (200 µg/mL) y piruvato de sodio (1mM) (Gibco®)). Las células adherentes se cultivan en incubadora 36 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 90 % de humedad. El mismo día la ascitis se recolectó del paciente, se recolectaron 20ml de sangre periférica para extracción de PBMC. Las células leucémicas primarias se obtienen de un paciente hombre de 71 años de edad con leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL) (Figura 11A) que recae 32 días después del trasplante de célula madre alogénica igualada. Las células T-PLL leucémicas se extraen como PBMC de la sangre periférica de los pacientes. Al momento que la muestra se saca, el paciente tuvo >90 % de blastos leucémicos en su conteo sanguíneo en diagnóstico clínico de rutina. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité ético del hospital de la Universidad de Würzburg.

En una alternativa del Ejemplo 3, la generación de células T de humano específicas de citomegalovirus (CMV): Brevemente, se generaron células dendríticas (DC) de monocitos adherentes a plástico de PBMC de donante HLA-A0201 negativo, B0702+. Después de 72 horas de cultivo en medio DC que contiene GM-CSF/IL4 (Cellgenix), DC se maduran en medio que contiene IL4(100ng/mL), GM-CSF(800IU/mL), LPS (10ng/mL) e IFN $\gamma$  (100U/mL) más 2.5ug/mL de péptido derivado de pp65 CMV, TPRVTGGG. Después de 16 horas, DC se irradian (30Gy) y co-incuban con células T CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>, CD57-puras en una proporción de 1:4 en medio que contiene 5 % de suero AB e IL21 (10ng/mL). Medio fresco, IL7 e IL15 se agregó los días 3, 5 y 7 de cultivo, antes de la evaluación del día 10-12. Las células se cultivan en medio DC Cellgenix. Suero AB de humano se utilizó de PAA. Se utilizó un grupo único por todos los experimentos. Cualquiera de IL4, IL7, IL15, IL21 se compraron de Peprotech o Cellgenix (con resultados idénticos). GM-CSF se compró de Gentaur. LPS (E.coli O:15) se compró de Sigma. El péptido específico de CMV restringido a HLA-B0702, TPRVTGGG, se compró de jpt. Para experimentos *in vivo*, las células T específicas de CMV se purifican además utilizando multímeros MHC (Immudex) etiquetados con APC. La coloración de multímero MHC se realizó a temperatura ambiente, seguido por aislamiento de células T multímero + MHC con perlas anti-APC (Miltenyi).

#### Ejemplo 4

##### Ensayos Funcionales

Citometría de Flujo:

La unión de proteínas de fusión de anticuerpo a células de tumor que presentan antígeno y/o linfocitos T se prueba por citometría de flujo. Para este propósito,  $2.5 - 5 \times 10^5$  células se incubaron con 10 µg/mL de scFv o 0,004 - 4 µg/mL de proteínas de fusión concentradas en 100 µl de una solución de tampón adecuada (tal como PBS + albúmina de suero de bovino, u otra solución de tampón adecuada) por cavidad en una placa en forma de V de 96 cavidades a 4 °C por 2 horas. Después de enjuagar tres veces con 150 µl de una solución de tampón adecuada, las células se incubaron con anticuerpo con etiqueta anti-His6 conjugado con FITC o Etiqueta anti-FLAG o Etiqueta anti-myc a RT por 30 minutos y se enjuagan de nuevo dos veces. Para regular y probar la coloración antecedente, se preparan adicionalmente dos muestras de cada tipo de célula, uno de células sin colorear y uno coloreado con anticuerpo de etiqueta anti-His6 conjugado con FITC sin ninguna proteína. Finalmente, las células se resuspenden en 500 µl de una solución de tampón adecuada, transfieren a tubos FACS, y analizan por citometría de flujo.

Ensayo de Estimulación PBMC:

Las propiedades estimuladoras de proteínas recombinantes se prueban en un ensayo de estimulación a base de célula. Por lo tanto, la activación de célula T mediada por anticuerpos biespecíficos y "construcciones de tridominio" se determinó al medir la estimulación de PBMC en términos de la liberación de IL-2 inducida.

Medición de Actividad Estimuladora de Construcciones:

Estirpe de célula de mieloma CD45 pos/HLA A2, U266, se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 cavidades de fondo plano a una densidad de 105 células por cavidad en 100 µl de medio de cultivo. Las proteínas estimuladoras concentradas se agregan como se indica en 100 µl de medio por cavidad y se preincuban por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> para asegurar suficiente unión. PBMC no estimuladas, descongeladas y aisladas el día antes,

se agregan entonces a la densidad indicada e incuban por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalmente, las placas se centrifugan por 5 minutos a 450 × g para recolectar los sobrenadantes libres de célula para cuantificación de IL-2 en ELISA.

5 ELISA Sandwich de IL-2:

Como un indicador para la actividad estimuladora, la activación de célula T inducida por anticuerpos biespecíficos, se mide en términos de la liberación de IL-2. En estimulación de PBMC, la concentración de IL-2 secretada en el sobrenadante se determinó por un ELISA sándwich IL-2.

10 Primero, una placa ELISA de 96 cavidades se revistió con 400 ng/100 µl por cavidad de anticuerpo IL-2 anti-humano de ratón durante la noche a 4 °C, seguido por saturación de sitios de unión no específicos con un regulador de bloqueo adecuado por 2 horas a RT. Mientras tanto, las diluciones seriales 1:2 de una IL-2 convencional se preparan por duplicado en diluyente de reactivo iniciando con una concentración máxima de IL-2 de 1,000 pg/mL. Después, los sobrenadantes que contienen IL-2 fueron 1:3 diluidos en medio RPMI 1640 que contiene 10 % de FCS y Pen-Strep (Penicilina-Estreptomicina). Tanto los sobrenadantes diluidos como los convencionales se transfieren hacia la placa ELISA e incuban por 2 horas a RT. Después, IL-2 se detectó por incubación con 17.5 ng/100 µl por cavidad de anticuerpo IL-2 anti-humano de cabra biotinilado por 2 horas a RT. Finalmente, 100 µl de estreptavidina conjugada con HRP, 1:200 diluida en diluyente reactivo, se agregó por cavidad e incubó por 20 minutos a RT. Cada placa se desarrolló utilizando una solución de sustrato TMB. Para lograr una señal antecedente, al menos 2 cavidades en cada placa se incuban con diluyente reactivo o medio solamente y el anticuerpo de detección más TMB. Entre cada paso de incubación, la placa se enjuagó tres veces con PBS que contiene 0.05 % de Tween-20 y una vez con PBS solamente.

25 Una curva convencional de siete puntos se creó al trazar las señales de absorbencia de cada muestra convencional contra la concentración de IL-2. De esta manera, la cantidad de IL-2 de cada sobrenadante podría determinarse por interpolación de la curva convencional ajustada con la ecuación de regresión no lineal para una asociación exponencial de fase utilizando GraphPad Prism®.

30 ELISA IFN-γ (alternativa del Ejemplo 4):

En 100µl de sobrenadante de cultivo celular, se midió la concentración de IFN-γ utilizando el Kit ELISA de IFN-γ de humano (Invitrogen™) después del protocolo del fabricante. Brevemente 50 µl de Tampón de Incubación se añadieron a cada cavidad de una placa de 96 cavidades preresvestida. 50 µl del Tampón Diluyente Convencional a cavidades cero. 50 µl de convencionales y muestras a cada cavidad. 50 µl de solución Conjugada de Biotina IFN-γ Hu biotinilada en cada cavidad. Se cubrió el lado de placa gentilmente para mezclar. La placa se cubre con la cubierta e incuba por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se aspiró completamente de las cavidades y el líquido se descartó. Las cavidades se enjuagaron 4 veces. Se añadieron 100 µl de Solución de Trabajo de Estreptavidina-HRP a cada cavidad. La placa se cubrió con la cubierta e incubó por 45 minutos a temperatura ambiente. La solución se aspiró completamente de cavidades y se descartó el líquido. Se añadieron 100 µl de Cromógeno Estabilizado a cada cavidad. El líquido en las cavidades se vuelve azul. Incubamos por 15-30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se añadieron 100 µl de Solución de Detención a cada cavidad. Se cubrió el lado de placa gentilmente para mezclar. La solución en las cavidades cambió de azul a amarilla. La absorbencia de cada cavidad se leyó con un lector de placa BioRad a 450 nm.

45 Ensayo de Citotoxicidad:

La estirpe HLA-A2/CD45 positiva, U266, o estirpe de mieloma U266 se marcó con 10 µM CFSE (Invitrogen Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit) en 350 µl PBS por 10 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. La reacción de marcado se detuvo por la adición de 5 ml de suero de bovino fetal (FCS), seguido por una incubación de 1 minuto a RT. Después de 2 enjuagues, las células dirigidas marcadas con CFSE se volvieron a suspender en medio de ensayo y co-incubaron con Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) de un donante sano HLA-A2 negativo a una proporción de 1:10 (5\*10<sup>5</sup> U266 y 5\*10<sup>6</sup> PBMC en 2 ml) y 27 nM de construcciones de anticuerpo como se indica. Una muestra tratada con Triton se utilizó como control positivo (100 % lisis) y una muestra sin construcción de anticuerpo como control negativo (0 % lisis). Después de 24 horas, células apoptóticas se visualizan por colorante 7AAD (Biozol, 10 minutos a RT) y % de lisis específica de células U266 marcadas con CFSE se calculó empleando técnicas de citometría de flujo.

60 Ensayo de Caspasa-3 (alternativa del Ejemplo 4):

Se realizó la coloración después de co-incubar las células dirigidas con células T (proporción 2:1 de células de tumor:células T) con o sin los polipéptidos específicos por 4 horas. La coloración de superficie para HLA-A2 y CD45 se realizó primero, seguido por fijación y permeabilización (Fix+Perm, BD Biosciences). El anticuerpo Caspasa-3 activado se agregó entonces por 30 minutos (BD Biosciences). Las células se enjuagan con 1xPBS +5 % de suero de humano (HS, PAA Laboratories) y analizan en un BD-FACS Canto-II. % de apoptosis específica se calculó como (% valor experimental - % liberación espontánea)/(100 % - % liberación espontánea)\*100.

Ensayo de azul Alamar (alternativa del Ejemplo 4):

El ensayo alamarBlue® (Abd Serotec) se utilizó para medir la proliferación y viabilidad de las células después de la exposición a toxinas. Brevemente, las células se desarrollaron en 100µl de medio de cultivo celular por cavidad (placa de 96 cavidades). Para análisis, se añadieron 10 µl de alamarBlue por cavidad e incubaron en la incubadora por 30-120 minutos. La absorbencia se leyó con un lector de placa BioRad a 570nm y 600nm. Para espacio libre solamente se utilizó el medio. El por ciento de diferencia en reducción de la proliferación celular entre los diferentes grupos polipéptido se calculó como se indica por el fabricante, utilizando células que se desarrollan en cultivo sin toxina como control.

Ensayo de Digoxigenina (alternativa del Ejemplo 4):

Primero, la peroxidasa de rábano picante (HRP, Sigma-Aldrich Chemie gmbH) se marcó con digoxigenina NHS-éster (Sigma-Aldrich Chemie gmbH) en una proporción molar 1/3. Dig-HRP se limpió con columnas de cromatografía micro Bio-Spin™ (BioRad y se almacenó a 4 °C en la oscuridad. Las células Colo-206F se incuban primero con polipéptidos indicados a varias concentraciones por 90 minutos. Las células se enjuagan con PBS y vuelven a suspender en medio de cultivo celular con Dig-HRP e incuban por 30 minutos. Después, las células se enjuagan dos veces con PBS y vuelven a suspender en 50µl PBS. Se añadieron 50µL de Cromógeno Estabilizado (Invitrogen™) por 15-30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron 50 µl de Solución de Detención y la absorbencia se leyó con un lector de placa BioRad a 450 nm.

Ratones (alternativa del Ejemplo 4):

Los ratones transgénicos HLA.A2, inmunodeficientes (NodScid IL-2rg -/- HLA.A2/B2m tg; número de reserva 14570, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) para el experimento *in vivo* (Figura 12A) se mantuvieron en nuestra instalación certificada para animales (ZEMM, Centro para medicina molecular experimental, hospital de la Universidad de Würzburg) de acuerdo con las directrices Europeas. Los ratones hembra, de 6-10 semanas de edad, se dividen en cinco grupos, seis ratones por grupo (n=30).  $5 \times 10^6$  células THP-1,  $1,25 \times 10^5$  células T CD8+ específicas de CMV (proporción 40/1 de célula de tumor:célula T) y se inyectaron 0.5µg de los polipéptidos intraperitonealmente (i.p.) como se indica. Después de la inyección, los ratones se monitorean por inspección diaria. Una segunda inyección de  $1.16 \times 10^5$  células T CD8+ específicas de CMV/ratón se da el día 13 y las inyecciones de los polipéptidos se repiten cada tres días una semana. Los animales se sacrifican cuando el incremento en el peso corporal fue mayor a 80 % o si aparecen moribundos de acuerdo con directrices institucionales.

La estructura de dominio, etiquetas de afinidad y conectores de las construcciones o polipéptidos utilizados en los Ejemplos 5-9 o Figuras 4-11D, se muestran en la Figura 3A-3B. Estas construcciones y todas las construcciones o polipéptidos utilizados en las Figuras 4-30 se preparan como se describe en los Ejemplos 1 y 2. El cultivo celular y ensayos funcionales en los Ejemplos 5-9 y cultivo, los ensayos funcionales y trabajo *in vivo* en cuanto a las Figuras 4-30 se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 3 y 4.

### **Ejemplo 5**

La estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA A2 negativas (PBMC (células mononucleares de sangre periférica) eliminadas de monocito) de un donante sano y cantidades variables de construcciones de anticuerpos biespecíficas HLA A2 y CD3 como se indica (Números 85, 82, 75 y 71). PHA-L (fitohemaglutinina, una lectina que causa estimulación no específica de células T; 1 µg/mL de concentración final) se utilizó como control positivo y se investigaron construcciones scFv de cadena sencilla con especificidad para HLA A2 (Número 4) o CD3 (Número 36). La producción de IL2 (Interleucina-2) por células T se midió por técnicas ELISA. No se encontró producción de IL2 en situaciones experimentales sin ninguna construcción. La información obtenida se representa en la Figura 4.

### **Ejemplo 6**

La estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA A2 negativas (PBMC eliminadas de monocito) de un donante sano y cantidades variables de "construcciones tridominio" agregadas ya sea por separado (Números 42, 45, 55; números que se refieren a construcciones como se representan en la Figura 3A-3B) o en combinaciones (42 + 45 o 42 + 55). PHA-L y construcciones scFv de cadena sencilla con especificidad para CD45 (Números 46 y 17) se dan como controles. La producción de IL2 por células T se midió por técnicas ELISA. No se encontró producción de IL en situaciones experimentales sin ninguna construcción. La información obtenida se representa en la Figura 5.

### **Ejemplo 7**

La estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA A2 negativas (PBMC eliminadas de monocito) de un donante sano y la construcción de anticuerpo biespecífico HLA A2 y CD3 sola (número 71, 27 nM) o en combinación con construcciones scFv de cadena sencilla que bloquean los epítopos

antigénicos en HLA A2 (Número 4, exceso por cien en comparación con la concentración de construcción 71, es decir, 2700 nM) o CD3 (Número 36, exceso por nueve en comparación con la concentración de construcción 71, es decir, 243 nM). La producción de IL2 por células T se midió por técnicas ELISA y PHA-L se da como control. La información obtenida se representa en la Figura 6.

5

### **Ejemplo 8**

La estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA A2 negativas (PBMC eliminadas de monocito) de un donante sano y la combinación de construcciones 42 y 45. La función estimuladora de célula T se bloqueó por construcciones de cadena sencilla específicas para HLA A2 (número 4) o CD45 (número 46). La complementación de la función estimuladora de célula T se probó al analizar las construcciones 42 y 45 por separado o la construcción scFv de cadena sencilla dirigida contra CD3 (número 36). La producción de IL2 por células T se midió por técnicas ELISA y PHA-L se da como control. La concentración de construcciones fue 27 nM, al menos que se indique de otra manera. ("9x" indica una concentración de 243 nM, "100x" una concentración de 2700 nM.) La información obtenida se representa en la Figura 7.

10

15

### **Ejemplo 9**

La estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA A2 negativas (PBMC eliminadas de monocito) de un donante sano y la combinación de construcciones 42 y 55. La función estimuladora de célula T se bloqueó por construcciones de cadena sencilla específicas para HLA A2 (número 4) o CD45 (número 46). La complementación de la función estimuladora de célula T se probó al analizar las construcciones 42 y 55 por separado o la construcción scFv de cadena sencilla dirigida contra CD3 (número 36). La producción de IL2 por células T se midió por técnicas ELISA y PHA-L se da como control. La concentración de construcciones fue 27 nM, al menos que se indique de otra manera. ("9x" indica una concentración de 243 nM, "100x" una concentración de 2700 nM.) La información obtenida se representa en la Figura 8.

20

25

Los resultados de los Ejemplos anteriores claramente demostraron que dos construcciones (42+45) o (42+55) primero tienen que unir sus ligandos en la superficie de una sola célula para complementar subsiguientemente la función que emplea célula T.

30

### **Ejemplo 10**

Lisis de la estirpe dirigida de mieloma CD45 y HLA A2 positiva, U266, por células T HLA A2 negativas (PBMC eliminadas de monocito) en la presencia de VLCD3-scFvHLA A2 (27 nMol) o V<sub>H</sub>-scFvCD45 (27 nMol) o la combinación de ambas de estas construcciones (27 nMol cada una) se determinó utilizando técnicas a base de citometría de flujo. El por ciento de lisis se calculó por células apoptóticas U266 divididas a través de las células totales U266 y se sustrae la apoptosis antecedente. La información obtenida se representa en la Figura 9.

35

40

### **Ejemplo 11**

Como partes de la construcción bipartita final, se diseñan dos polipéptidos, cada uno compuesto de un fragmento variable de cadena sencilla de unión a antígeno (scFv) y ya sea el dominio de cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) o cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) de un anticuerpo anti-CD3 que activa la célula T (Figura 10). Cuando estos dos polipéptidos unen sus antígenos respectivos en la superficie de una sola célula, los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> interactúan entre sí para reconstituir el sitio de unión anti-CD3 original. De esta manera, el heterodímero trispecifico formado en diana emplea y estimula las células T para destrucción de célula de tumor.

45

Este escenario se valida completamente *in vitro* cuando los linfocitos T se confrontan con células dirigidas que se han incubado con los dos polipéptidos diferentes. Como prueba de principio, el antígeno HLA-A2 de mayor histocompatibilidad y el marcador de linaje hematopoyético CD45 se dirigieron como antígenos, primero y segundo, los cuales ambos se expresan en células de mieloma U266, células primarias de un paciente con leucemia prolinfocítica del linaje de célula T (T-PLL), y blastos leucémicos mieloide agudos THP-1 (Figura 11A-D). Debido a la interacción V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> descrita, el heterodímero ahora trispecifico estimula potencialmente las células T para secretar interleucina-2 (IL-2) (Figura 11A) y someter a lisis las células de tumor etiquetadas a concentración nanomolar (Figura 11B), la eficacia citotóxica siendo muy similar a aquella de un anticuerpo que activa la célula T biespecifica, que se empleó como un control positivo (Figura 11A, panel izquierdo), Mack, 1995, *Proc Natl Acad Sci* **92**, 7021-7025. Cuando los polipéptidos se agregan por separado uno de otro, no indujeron linfocitos T para someter a lisis las células dirigidas. Estos resultados están en línea con datos estructurales que indican que ambos dominios, V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, se requieren para conferir suficiente afinidad al antígeno dirigido (Figura 11A, 11B), Colman, 1987, *Nature* **326**, 358-363; Amit, 1986, *Science* **233**, 747-753. Igualmente, los resultados revelan que la posible homodimerización de cualquiera de los brazos, V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>, resulta en un efecto biológico medible insignificante.

50

55

60

Para demostrar que las dos moléculas deben unir primero sus antígenos en la superficie de la célula dirigida para que ocurra la heterodimerización V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>, los fragmentos variables de cadena sencilla específicos para HLA-A2 y CD45 se utilizan para bloquear los epítopos respectivos en el diana. Como se muestra en la Figura 11C, cuando

65

están presentes en mayor exceso, estos inhibidores previnieron que los dos polipéptidos activen las células T en una manera dependiente de dosis. Además, las células T no se estimularon cuando se omitieron las células dirigidas (datos no mostrados) o cuando se probó que las células dirigidas expresan CD45 solamente (células RAJI, Figura 11D) o no expresan molécula diana (KMS-12-BM, Figura 11D).

### **Ejemplo 12**

Para prueba de concepto *in vivo*, se recurre a un modelo de trasplante alogénico de célula madre desigual, en el cual las células hematopoyéticas y leucémicas residuales del paciente, todas HLA-A2 y CD45 positivas, deben eliminarse para dar a las células madre donantes alogénicas (HLA-A2–negativas, CD45-positivas) una oportunidad de injertar y reconstituir la hematopoyesis (véase Figura 2). Para poner a prueba la especificidad de la construcción bipartita, se utilizaron los ratones inmunodeficientes que expresan el transgen HLA-A2 de humano en virtualmente todas las células nucleadas, la pregunta siendo si los tejidos de murino HLA-A2 positivos pero CD45 negativos sufrirían de daño colateral. Las células THP-1 se inyectaron intraperitonealmente con o sin linfocitos T CD8 de un donante HLA-A2 negativo, que se ha seleccionado para especificidad para citomegalovirus (CMV) para evitar la reactividad inmune anti-murino de humano. Los tumores intraperitoneales se desarrollaron rápidamente en ratones que no reciben los polipéptidos, y en ratones tratados ya sea con tipos de molécula sencilla o con la combinación de ambos polipéptidos pero sin células T. En todos los casos, la enfermedad diseminada fatal se desarrolló dentro de 3 a 4 semanas (Figura 12A). En contraste extremo, todos los ratones que llevan tumor tratados con células T e inyecciones repetidas de ambos polipéptidos sobrevivieron al final del experimento el día 31, no obstante los tumores palpables en el sitio de inyección. Estos resultados muestran claramente que la construcción bipartita dirige realmente las células T independientemente de su especificidad en las células de tumor que simultáneamente expresan ambas moléculas dirigidas (HLA-A2 y CD45) *in vivo*. Además, se causaría que una célula T reclute anticuerpos biespecíficos contra HLA-A2 al redirigir las células T contra todos los tejidos de murino HLA-A2 positivos. Del mismo modo, un anticuerpo biespecífico de unión CD45 habría mediado la lisis de todas las células hematopoyéticas, incluyendo blastocitos leucémicos THP-1 y células T del donante. En nuestra propia configuración, sin embargo, la inyección de polipéptido HLA-A2 específico en los animales transgénicos HLA-A2 no causó aparente toxicidad.

Para examinar además la posible toxicidad por espectadores, empleamos un ensayo de apoptosis altamente sensible en células THP-1 y monocitos HLA-A2 negativos pero CD45 positivos, los últimos representando el compartimento espectador sano. Como se representa en la Figura 12B, observamos activación de caspasa-3 en células THP-1 pero no en monocitos tratados en la misma cavidad con la combinación de los polipéptidos o el control positivo biespecífico y células T donantes. Las células THP-1 cultivadas con células T y polipéptidos individuales no se afectan. Estas observaciones de nuevo muestran claramente el inicio de apoptosis exclusivamente en la población dirigida de antígeno positivo doble, mientras se dan células espectadoras HLA-A2 negativas. Estos experimentos modelan de modo muy exacto la situación clínica sería de pacientes con leucemia con un trasplante de célula madre desigual HLA. El planteamiento combinatorio de utilizar una molécula HLA distintiva y CD45 ayuda a mejorar los efectos deseados de injerto contra leucemia al redirigir las células T del donante contra blastocitos leucémicos de tanto origen mieloide como linfoide.

### **Ejemplo 13**

Para aventurarse en tumores sólidos, dirigimos el planteamiento combinatorio a molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM) y antígenos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Ambos antígenos se sobre-expresan en varios carcinomas y se han estudiado extensivamente en las pruebas clínicas de fase II y III. La expresión de EGFR se asocia cercanamente con la proliferación celular, mientras EpCAM está presente en la superficie basolateral de virtualmente todo el epitelio simple y se encontró recientemente que actúa como una proteína de señalización en la trayectoria *Wnt*, Maetzel, 2009, *Nat Cell Biol* **11**, 162-171. Como se ilustra en la Figura 13A, los dos polipéptidos activan la liberación de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) de linfocitos donantes co-incubados y median la apoptosis de la estirpe de cáncer doble positiva, Colo-206F, a concentraciones nanomolares (Figura 13A, 13B), pero solamente cuando se dan en combinación y no con cualquier parte sola. Como un descendiente de tejido neuroepitelial, la estirpe de melanoma FM-55 carece de EpCAM, y por lo tanto fue completamente resistente a los polipéptidos (Figura 13A, 13B). Aunque la expresión de EGFR y EpCAM se solapa ampliamente en células de carcinoma proliferantes, células epiteliales no proliferantes, por ejemplo, de hígado y páncreas que expresan solamente antígenos EGFR o EpCAM, respectivamente, debe ser menos susceptible a o protegerse de los ataques de dos frentes. Notablemente, las toxicidades hepáticas y pancreáticas se han limitado por dosis para anticuerpos EpCAM monoclonales de alta afinidad en pruebas clínicas (para revisión ver, [Munz, 2010, \*Cancer Cell Int\* 10:44](#)).

### **Ejemplo 14**

La validación adicional de la estrategia de complementación funcional bipartita se realizó por experimentos *in vitro* extensivos, utilizando una combinación de diferentes polipéptidos, dirigiendo varios antígenos de superficie celular en diferentes estirpes de humano.



Las estirpes de tumor de humano HLA A2 positivas, FM-55, (mieloma), Colo-206F (cáncer de colon) y OVCAR (cáncer ovárico) se co-incubaban con PBMC HLA-A2 negativas de un donante sano, polipéptido contra HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>) - HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y con un segundo polipéptido dirigiendo ya sea CEA (CD3(V<sub>H</sub>) - CEA(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)), EGFR (CD3(V<sub>H</sub>) - EGFR(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) o Her2 (CD3(V<sub>H</sub>) - Her2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)). La producción de IL2 o IFN- $\gamma$  por linfocitos se midió por técnicas ELISA. Estos datos demuestran que (i) una combinación específica de antígenos, una firma de antígeno, puede expresarse en carcinomas de origen diverso (tejido de piel, neuroepitelial, intestinal y ovárico), (ii) la firma de antígeno es accesible con nuestra estrategia de complementación funcional bipartita utilizando un conjunto de polipéptidos específico para la firma de antígeno. Los datos obtenidos se representan en las Figuras 14, 15 y 16.

### 10 **Ejemplo 15**

Para demostrar la capacidad de intercambio del dominio funcional, los fragmentos F1 y F2 de un conjunto de polipéptidos se intercambiaron entre sí, reteniendo su capacidad de complementación específica para restauración en diana de su dominio de anticuerpo original para emplear células T. Por lo tanto, se utilizó el conjunto de polipéptidos contra el antígeno dirigido CD45 y HLA-A2. El polipéptido contra CD45 tuvo CD3(V<sub>L</sub>) como el fragmento F1 y el polipéptido contra HLA-A2 tuvo CD3(V<sub>H</sub>) como el fragmento F2. La estirpe de mieloma CD45 y HLA-A2 positiva, U266, se co-incubó con células T HLA-A2 negativas de un donante sano y polipéptidos contra CD45 (CD3(V<sub>L</sub>) - CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-A2 (CD3(V<sub>H</sub>) - HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) en cantidades variables. El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN $\gamma$  en situaciones experimentales sin ningún polipéptido. La información obtenida se representa en la Figura 17.

### 25 **Ejemplo 16**

La estrategia de complementación funcional bipartita se probó además al dirigir un conjunto de antígenos, ya utilizados como dianas para terapia de anticuerpo de cáncer (EGFR, EpCAM y Her2) (Her2 es un diana para Trastuzumab en cáncer de mama, EGFR es un diana para Cetuximab en cáncer colorectal y EpCAM es un diana para Catumazumab para el tratamiento de ascitis neoplásica). Las células EGFR, EpCAM y Her2 positivas (Colo-206F, CX-1 y OVCAR) se co-incubaban con PBMC de un donante sano y la combinación de polipéptidos contra EGFR (CD3(V<sub>H</sub>) - EGFR(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)), EpCAM (CD3(V<sub>L</sub>) - EpCAM(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)) y Her2 (CD3(V<sub>H</sub>) - Her2(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)). La complementación de función estimuladora de linfocito se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN $\gamma$  en situaciones experimentales sin ningún polipéptido. La información obtenida se representa en las Figuras 18 y 19.

### 35 **Ejemplo 17**

Para probar una combinación de antígenos con correlación clínica cercana, se utilizó la combinación de CD45 y CD138 para dirigir células de mieloma múltiple (MM) de humano. La mayoría de las células MM de humano son positivas para CD45 y CD138. Una célula T que recluta anticuerpos biespecíficos contra CD45 mataría todas las células hematopoyéticas de un paciente y contra CD138 causaría efectos secundarios graves debido a su expresión en varios tejidos normales (células epiteliales, endoteliales, células trofoblásticas y células glandulares del tracto GI, The Human Protein Atlas, Versión: 10.0, actualización de Atlas: 12-09-2012). En contraste, la combinación de CD45 y CD138 se encontró exclusivamente en células de plasma y células MM y por lo tanto es una buena firma de antígeno para el planteamiento de terapia dirigida. La estirpe de mieloma múltiple de humano CD45 y CD138 positivas, AMO-1, se co-incubó con PBMC de un donante sano y la combinación de polipéptidos contra CD45 (CD3(V<sub>L</sub>) - CD45(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)) y CD138 (CD3(V<sub>H</sub>) - CD138(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)). La complementación de función estimuladora de linfocito se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN $\gamma$  en situaciones experimentales con polipéptidos sencillos o sin ningún polipéptido. La información obtenida se representa en la Figura 20.

### 50 **Ejemplo 18**

Una aplicación adicional de la estrategia de complementación funcional bipartita es dirigir los antígenos sencillos en la superficie celular y matar las células de tumor de antígeno positivo sencillas. Una desventaja principal para la célula T que recluta anticuerpos biespecíficos con sitios de unión antiCD3 funcionales son los efectos secundarios graves causados por la activación de la célula T no específica y liberación de citoquina (Linke, R. et al. Catumaxomab: clinical development and future directions. MAbs 2, 129-136 (2010)). La ventaja de esta estrategia de complementación funcional bipartita es de hecho los anticuerpos, de modo que el dominio funcional antiCD3 que activa la célula T se restaura exclusivamente en la célula dirigida. Sin la célula dirigida, no está presente el dominio que activa la célula T. Las células de mieloma múltiple de humano CD45 y CD138 positivas, AMO-1 y U266, se co-incubaban con PBMC de un donante sano y la combinación de polipéptidos contra un antígeno dirigido sencillo, ya sea CD138 (CD3(V<sub>H</sub>) - CD138(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>) + CD3(V<sub>L</sub>) - CD138(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)) o CD45 (CD3(V<sub>H</sub>) - CD45(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>) + CD3(V<sub>L</sub>) - CD45(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)). La complementación de función estimuladora de linfocito se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN $\gamma$  en situaciones experimentales con polipéptidos sencillos o sin ningún polipéptido. Los datos obtenidos se representan en la Figura 21 y 22. En la Figura 23 se ilustra el planteamiento de antígeno sencillo, al utilizar un conjunto de polipéptidos que dirige dos epítotos diferentes (parte

superior) o el mismo epítipo (parte inferior) en el antígeno dirigido A1.

### **Ejemplo 19**

5 Este es un ejemplo para demostrar que la estrategia de complementación funcional puede elaborarse además para suministro de carga dirigido y que diferentes maneras efectoras son posibles para matar una célula dirigida. Al complementar los fragmentos F1 y F2 de un conjunto de polipéptidos unidos en diana, el sitio de unión de anticuerpo recientemente formado puede unir cualquier molécula que es específica. Para dirigir una carga etiquetada con HIS a una célula dirigida, se utilizaron los fragmentos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti-His(hexa-histidina). Después de la unión simultánea de polipéptido 1 (antiHis(V<sub>L</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y polipéptido 2 (antiHis(V<sub>H</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) a sus antígenos dirigidos específicos CD45 y HLA-A2, un sitio de unión hexa-histidina se complementa en diana que une cargas marcadas con histidina con alta afinidad. La carga es una toxina etiquetada con HIS como se da en este ejemplo aquí. Las células CD45 y HLA-A2 positivas, THP-1, se co-incubaron con un componente de toxina de *Clostridium perfringens* etiquetada con histidina(His) (Figura 24) o una subunidad A de toxina Shiga etiquetada con histidina(His) (Figuras 25, 26) en combinación con polipéptidos contra CD45 (antiHis(V<sub>L</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-A2 (antiHis(V<sub>H</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)). La complementación de la unión de toxina etiquetada con his y muerte de célula dirigida subsiguiente se valoró al medir la viabilidad celular utilizando un ensayo alamarBlue®. A la concentración más alta de polipéptidos utilizados (80nM), una clara diferencia en la muerte de célula dirigida, medida como reducción en viabilidad celular, se encontró en situaciones experimentales con una combinación de ambos polipéptidos en comparación con polipéptidos sencillos.

### **Ejemplo 20**

25 Para demostrar además la versatilidad, flexibilidad y la capacidad de intercambio de la estrategia de complementación funcional bipartita, los fragmentos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti-Digoxigenina se utilizaron para identificar y marcar células positivas de antígeno doble con HRP (peroxidasa de rábano picante) marcada con Digoxigenina. Células Colo-206F EGFR y EpCAM positivas se co-incubaron con polipéptidos contra EGFR (antiDig(V<sub>H</sub>) - EGFR(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)) y EpCAM (antiDig(V<sub>L</sub>) - EpCAM(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)). En complementación dirigida de la anti-Digoxigenina de dominio funcional, indicada por marcado con Digoxigenina-HRP de células Colo-206F, se valoró al medir la actividad de peroxidasa, utilizando un Kit ELISA convencional (Invitrogen™). Se encontró una diferencia clara en células dirigidas marcadas con Dig-HRP en situación experimental con una combinación de ambos polipéptidos en comparación con polipéptidos sencillos. Los datos obtenidos se representan en la Figura 27.

### **Ejemplo 21**

35 Utilizando los antígenos leucocíticos de humano (HLA) como un brazo para complementación funcional bipartita restringida a antígeno dual, esta estrategia de haplotipo se validó además al intercambiar los dominios funcionales de los polipéptidos con fragmentos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti-HLA-Cw6. PBMC del paciente primarias HLA-Cw6 positivas se co-incubaron con PBMC HLA-Cw6 negativas de un donante sano, polipéptido contra CD45 (CD3(V<sub>L</sub>) - CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-Cw6 (CD3(V<sub>H</sub>) - HLA-Cw6(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)). La producción de IFN<sub>γ</sub> por linfocitos se midió por técnicas ELISA. Estos datos demuestran que las células hematopoyéticas de pacientes con otros haplotipos diferentes a HLA-A2 pueden dirigirse simplemente al intercambiar un dominio dirigido (anti HLA-A2, Figura 5, 7-9, 11A-12B) por otro (anti HLA-Cw6). Los datos obtenidos se representan en las Figuras 28.

### **Ejemplo 22**

45 La estrategia de complementación funcional bipartita inducida por antígeno dual se validó además en un ensayo de paciente *in vitro*, utilizando células primarias de cáncer del paciente recientemente aisladas y dianas de antígeno ya utilizados para terapia de cáncer en la clínica o pruebas clínicas (EGFR, EpCAM, CEA y Her2). Las células malignas de un paciente hombre de 48 años de edad con cáncer pancreático metastático se co-incubaron con los linfocitos de sangre periférica propios del paciente y la combinación de polipéptidos contra EGFR (CD3(V<sub>H</sub>) - EGFR(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)), EpCAM (CD3(V<sub>L</sub>) - EpCAM(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)), Her2 (CD3(V<sub>H</sub>) - Her2(V<sub>H</sub>+V<sub>L</sub>)), CEA (CD3(V<sub>H</sub>) - CEA(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>) - HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)). La complementación de función estimuladora de linfocito se valoró por producción de IFN<sub>γ</sub> reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN<sub>γ</sub> en situaciones experimentales sin ningún polipéptido. Estos datos demuestran el potencial de esta estrategia para utilizar células inmunes propias del paciente para dirigir y matar sus células transformadas malignas. Los datos obtenidos se representan en las Figuras 29.

### **Ejemplo 23**

60 Una población de célula T restringida a CMV CD3/CD8 positiva altamente enriquecida se utilizó para mostrar que cualquier célula T, independientemente de su especificidad, puede servir como célula efectora y matar las células de tumor de antígeno positivo doble por esta estrategia de complementación. Las células U266 y THP-1, CD45 y HLA-A2 positivas se co-incubaron con células T específicas de citomegalovirus (CMV) de un donante sano HLA-A2 negativo y polipéptidos contra CD45 (CD3(V<sub>H</sub>)-CD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) y HLA-A2 (CD3(V<sub>L</sub>)-HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) en cantidades variables. El anticuerpo scFv aleatorio biespecífico (CD3(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) x HLA-A2(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)) se utilizó como un control positivo.

El empleo de célula T se valoró por producción de IFN $\gamma$  reactiva, medida por técnicas ELISA. No se encontró producción de IFN $\gamma$  en situaciones experimentales con polipéptidos sencillos o sin ningún polipéptido. Los datos obtenidos se representan en la Figura 30. Las células del mismo grupo alícuota congelado, células T específicas de CMV y células THP-1, se utilizaron para el modelo de murino *in vivo* (Figura 12A).

5

#### **Ejemplo 24**

Esta ilustración representa el potencial para dirigir alérgeno/clones de célula B específicos autoinmunes con la estrategia de complementación funcional bipartita. Al utilizar un alérgeno sintético como porción dirigida, el polipéptido unido a alérgeno se unirá específicamente a su receptor de célula B clonotípico expresado en la superficie del clon de célula B específico de alérgeno. El segundo brazo de la estrategia bipartita utilizará un polipéptido específico de célula B (CD19, CD20, CD38, CD138), restringiendo la complementación continua del dominio efector con muerte de célula dirigida subsiguiente para el clon de célula B específico de alérgeno. El último diana de esta estrategia es eliminar el clon de célula B que causa una enfermedad alérgica o autoinmune (parte superior de la Figura 31) mientras da a las células B otras especificidades células diferentes a células B (por ejemplo, mastocitos o células basofílicas) que unen el anticuerpo responsable de la enfermedad a través de receptores Fc (parte inferior de la Figura 31).

Las características de la presente invención descritas en la especificación, las reivindicaciones, y/o en los dibujos acompañantes pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de los mismos, ser material para realizar la invención en varias formas de la misma.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Julius-Maximilians-Universitat Wiirzburg  
 <120> Complementación funcional bipartite inducida por antígeno dual  
 <130> W1010 PCT S3  
 30 <150> EP 12 15 1125.7  
 <151> 13-01-2012  
 <160> 198  
 35 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 119  
 40 <212> PRT  
 <213> VH anti-CD3  
 <400> 1

ES 2 653 287 T3

Asp 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 Arg Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 2  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> VL anti-CD3

5

<400> 2

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

10

ES 2 653 287 T3

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Ala Ala Ala  
 100 105 110

<210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> VH anti-CD3

5

<400> 3

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

10

ES 2 653 287 T3

<210> 4  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> VL anti-CD3

5

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

10 <210> 5  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> huMAb anti-CD variante 9 VH

15 <400> 5

ES 2 653 287 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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

- <210> 6
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> huMAb anti-CD variante 1 VL
- <400> 6

ES 2 653 287 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 Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

Thr

- <210> 7
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Anti-CD3 VH (L2K)
- <400> 7

5

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30

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

10



ES 2 653 287 T3

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 8  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VL (L2K)  
 <400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

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

10 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

15 <210> 9  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VH (145.2C11)  
 <400> 9

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

ES 2 653 287 T3

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

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

Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe  
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
 115

<210> 10  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VL (145.2C11)

<400> 10

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp  
 85 90 95

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

ES 2 653 287 T3

<210> 11  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Anti-HIS VH

5

<400> 11

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

Glu Ser Gln Ser Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ala

10 <210> 12  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Anti-HIS VL

15 <400> 12

ES 2 653 287 T3

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

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

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 35 40 45

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

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110

Glu Ile Lys Arg  
 115

5 <210> 13  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Anti-DIG VH

10 <400> 13



ES 2 653 287 T3

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

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

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

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

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe  
 115

5 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VH CDR1 (WT)

<400> 15

10 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His  
 1 5 10

15 <210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VH CDR2 (VH5)

<400> 16

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

Gly

20 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VH CDR3 (WT)

25 <400> 17

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr  
 1 5 10

30 <210> 18  
 <211> 10 <212> PRT  
 <213> Anti-CD3 VK CDR1 (WT)  
 <400> 18

ES 2 653 287 T3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn  
1 5 10

5  
<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VK CDR2 (WT)  
  
<400> 19

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
1 5

10  
  
15  
<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VK CDR3 (WT)  
  
<400> 20

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

20  
  
25  
<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR1 (WT)  
  
<400> 21

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His  
1 5 10

30  
  
35  
<210> 22  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR2 (WT)  
  
<400> 22

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

Asp

40  
  
45  
<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR3 (WT)  
  
<400> 23

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr  
1 5 10

50  
<210> 24  
<211> 10  
<212> PRT

ES 2 653 287 T3

<213> Anti-CD3 VK CDR1 (WT)

<400> 24

5                   Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn  
                  1                   5                   10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Anti-CD3 VK CDR2 (WT)

<400> 25

15                   Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
                  1                   5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Anti-CD3 VK CDR3 (WT)

<400> 26

25                   Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
                  1                   5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Anti-CD3 VH CDR1 (UCHT-1)

<400> 27

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

<210> 28

35 <211> 17

<212> PRT

<213> Anti-CD3 VH CDR2 (UCHT-1)

<400> 28

40                   Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
                  1                   5                   10                   15

**Asp**

<210> 29

45 <211> 11

<212> PRT

<213> Anti-CD3 VH CDR3 (UCHT-1)

<400> 29

50                   Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
                  1                   5                   10





ES 2 653 287 T3

<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VL CDR 1 (L2K)

5 <400> 36

Ser Ser Val Ser Tyr  
1 5

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VL CDR 3 (L2K)

10 <400> 37

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

15

<210> 38  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR 1 (145-2C11)

20 <400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly  
1 5

25

<210> 39  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR 2 (145-2C11)

30 <400> 39

Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile  
1 5

35 <210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VH CDR 3 (145-2C11)

40 <400> 40

Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr  
1 5

45 <210> 41  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Anti-CD3 VL CDR 1 (145-2C11)

50 <400> 41

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
1 5

55 <210> 42  
<211> 9  
<212> PRT

ES 2 653 287 T3

<213> Anti-CD3 VL CDR 3 (145-2C11)

<400> 42

5 Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Anti-HIS VH CDR1

<400> 43

15 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr  
1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Anti-HIS VH CDR2

<400> 44

25 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr  
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Anti-HIS VH CDR3

<400> 45

Glu Ser Gln Ser Gly Ala Tyr  
1 5

<210> 46

35 <211> 11

<212> PRT

<213> Anti-HIS VL CDR1

<400> 46

40 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

<210> 47

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Anti-HIS VL CDR3

<400> 47

50 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr  
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

ES 2 653 287 T3

<213> Anti-DIG VH CDR1

<400> 48

5

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Anti-DIG VH CDR2

<400> 49

Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ala  
1 5

15

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Anti-DIG VL CDR1

<400> 50

Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
1 5

25

<210> 51

<211> 123

<212> PRT

<213> Anti-HLA-A2 VH

30

<400> 51

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

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

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

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

ES 2 653 287 T3

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

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

Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5  
<210> 52  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VL  
  
<400> 52

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

15  
<210> 53  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-Cw6 VH  
  
<400> 53



ES 2 653 287 T3

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

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

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

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

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

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

- <210> 55
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Anti-EpCAM VH
- <400> 55

5

ES 2 653 287 T3

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

<210> 56  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Anti-EpCAM VL  
 <400> 56

5

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

10



ES 2 653 287 T3

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys

5 <210> 57  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Anti-HER2 VH  
  
<400> 57

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 Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10  
  
15 <210> 58  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Anti-HER2 VL  
  
<400> 58

ES 2 653 287 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 Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 20 25 30

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

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

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

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

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

5 <210> 59  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Anti-EGFR-1 VH

10 <400> 59

ES 2 653 287 T3

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

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

Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 60  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Anti-EGFR-1 VL

5

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

10

ES 2 653 287 T3

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

5

- <210> 61
- <211> 127
- <212> PRT
- <213> Anti-CEA VH
- <400> 61



ES 2 653 287 T3

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

Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45

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

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

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

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

- <210> 63
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Anti-CD45 VH
- <400> 63

5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

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

10

ES 2 653 287 T3

Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 115 120

5 <210> 64  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD45 VL

<400> 64

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95

10 Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

15 <210> 65  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> VH anti-CD138

<400> 65

ES 2 653 287 T3

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

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

Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln Met  
 65 70 75 80

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

Arg Glu Gln Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

- 5 <210> 66
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> VL anti-CD138
- 10 <400> 66



ES 2 653 287 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg  
 85 90 95

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

<210> 67  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> Anti-HLA-A2 scFv  
 <400> 67

5

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

10

ES 2 653 287 T3

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

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

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

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

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

Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
 100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln  
 130 135 140

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 145 150 155 160

Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu  
 180 185 190

Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 195 200 205

Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 225 230 235 240

Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 245

<210> 68  
 <211> 245

<212> PRT  
<213> Anti-HLA-Cw6 scFv

<400> 68

5

ES 2 653 287 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 Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Ser Phe Ser Trp Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro  
 130 135 140  
 Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Ala Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175  
 Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 180 185 190  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
 195 200 205  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Gln Ser Tyr Asp Asn Phe Asp Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Val Leu Gly  
 245

# ES 2 653 287 T3

<210> 69  
<211> 248  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM scFv

5

<400> 69

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

225

230

235

240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
245

5

<210> 70

<211> 242

<212> PRT

<213> Anti-HER2 scFv

<400> 70

ES 2 653 287 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 130 135 140  
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 210 215 220  
 Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Lys





ES 2 653 287 T3

180

185

190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His  
210 215 220

Phe Asp His Leu Pro Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
225 230 235 240

Lys

- <210> 72
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> Anti-CEA scFv
- <400> 72

ES 2 653 287 T3

Ser Arg Val Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala  
1 5 10 15

Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr  
20 25 30

Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp  
35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr  
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr  
100 105 110

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
130 135 140

Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg  
145 150 155 160

Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
165 170 175

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser  
180 185 190

Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp  
210 215 220

Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
245 250

ES 2 653 287 T3

<210> 73  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD45 scFv

5

<400> 73

```

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
          20           25           30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
          50           55           60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
          85           90           95

Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Lys
          100          105          110

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
          115          120          125

Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
    
```

ES 2 653 287 T3

130

135

140

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser  
145 150 155 160

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
165 170 175

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr Pro  
180 185 190

Ser Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr  
195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr  
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
245 250

<210> 74  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> Anti-CD138 scFv

5

<400> 74

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

<210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VH CDR1  
5  
<400> 75

Gly Val Thr Leu Ser Asp Tyr Gly  
1 5

10 <210> 76  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VH CDR2  
15 <400> 76

Ile Arg Asn Asp Gly Ser Asp Lys  
1 5

20 <210> 77  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VH CDR3  
25 <400> 77

Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
1 5 10 15

30 <210> 78  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VL CDR1  
<400> 78

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
1 5

40 <210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-A2 VL CDR3  
<400> 79

Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
1 5

45 <210> 80  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-Cw6 VH CDR1  
50 <400> 80

ES 2 653 287 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

5 <210> 81  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HLA-Cw6 VH CDR2  
  
<400> 81

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr  
1 5

10 <210> 82  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Anti-HLA-Cw6 VH CDR3  
  
<400> 82

Ala Arg Tyr Ser Phe Ser Trp Phe Asp Val  
1 5 10

20 <210> 83  
<211> 6  
<212> PRT  
25 <213> Anti-HLA-Cw6 VL CDR1  
  
<400> 83

Ala Leu Gly Asp Lys Tyr  
1 5

30 <210> 84  
<211> 10  
<212> PRT  
35 <213> Anti-HLA-Cw6 VL CDR3  
  
<400> 84

Gln Ser Tyr Asp Asn Phe Asp Ser Pro Val  
1 5 10

40 <210> 85  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM CDR1 VH  
  
<400> 85

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp  
1 5

50 <210> 86  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM CDR2 VH  
  
<400> 86



ES 2 653 287 T3

Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile  
1 5

5  
<210> 87  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM CDR3 VH  
  
<400> 87

Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr  
1 5 10

10  
  
15  
<210> 88  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM CDR1 VL  
  
<400> 88

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

20  
  
25  
<210> 89  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-EpCAM CDR3 VL  
  
<400> 89

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

30  
  
35  
<210> 90  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HER2 VH CDR1  
  
<400> 90

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr  
1 5

40  
  
45  
<210> 91  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-HER2 VH CDR2  
  
<400> 91

Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr  
1 5

50  
<210> 92  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Anti-HER2 VH CDR3

ES 2 653 287 T3

<400> 92

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

5 <210> 93  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Anti-HER2 VL CDR1

10 <400> 93

Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 1 5

15 <210> 94  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Anti-HER2 VL CDR3

20 <400> 94

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr  
 1 5

25 <210> 95  
 <211> 10 <212> PRT  
 <213> Anti-EGFR-1 VH CDR1  
 <400> 95

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr  
 1 5 10

30 <210> 96  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Anti-EGFR-1 VH CDR2

35 <400> 96

Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr  
 1 5

40 <210> 97  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Anti-EGFR-1 VH CDR3

45 <400> 97

Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

50 <210> 98  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Anti-EGFR-1 VL CDR1

<400> 98

ES 2 653 287 T3

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
1 5

5 <210> 99  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-EGFR-1 VL CDR3  
  
<400> 99

Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu Ala  
1 5

10 <210> 100  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> Anti-CEA VH CDR1  
  
<400> 100

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr  
1 5

20 <210> 101  
<211> 8  
<212> PRT  
25 <213> Anti-CEA VH CDR2  
  
<400> 101

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser  
1 5

30 <210> 102  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Anti-CEA VH CDR3  
  
35 <400> 102

Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10 15

40 <210> 103  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Anti-CEA VL CDR1  
  
45 <400> 103

Gln Asn Val Gly Thr Asn  
1 5

50 <210> 104  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CEA VL CDR3  
  
<400> 104

ES 2 653 287 T3

Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr  
1 5

5 <210> 105  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Anti-CD45 VH CDR 1  
  
<400> 105

Gly Phe Asp Phe Ser  
1 5

10  
  
15 <210> 106  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD45 VH CDR 2  
  
<400> 106

Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile  
1 5

20  
  
25 <210> 107  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Anti-CD45 VL CDR 1  
  
<400> 107

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr  
1 5 10

30 <210> 108  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD45 VL CDR 3  
  
35 <400> 108

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr  
1 5

40 <210> 109  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD138 VH CDR1  
  
45 <400> 109

Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp  
1 5

50 <210> 110  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD138 VH CDR2  
  
<400> 110

ES 2 653 287 T3

Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr  
1 5

5 <210> 111  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Anti-CD138 VH CDR3  
  
<400> 111

10 Ala Arg Glu Gln Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10 15

<210> 112  
<211> 6  
<212> PRT  
15 <213> Anti-CD138 VL CDR1  
  
<400> 112

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr  
1 5

20 <210> 113  
<211> 9  
<212> PRT  
25 <213> Anti-CD138 VL CDR3  
  
<400> 113

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg Thr  
1 5

30 <210> 114  
<211> 388  
<212> PRT  
<213> pelB-CD3VL-scFvEPCAM(VH-VL)-6His  
  
35 <400> 114

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala  
 130 135 140

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

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro  
 165 170 175

Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn  
 180 185 190

ES 2 653 287 T3

Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp  
 195 200 205

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu  
 210 215 220

Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro  
 225 230 235 240

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val  
 260 265

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val  
 275 280 285

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln  
 290 295 300

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys  
 305 310 315 320

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg  
 325 330 335

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 340 345 350

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser  
 355 360 365

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His  
 370 375 380

His His His His  
 385

<210> 115  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> pelB-CD3VH-scFvHer2-6HIS

5

<400> 115





ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 290 295 300

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val  
 305 310 315 320

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 325 330 335

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 340 345 350

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 355 360 365

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr  
 370 375 380

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His  
 385 390 395 400

His His His His

<210> 116  
 <211> 403  
 <212> PRT  
 <213> pelB-CD3VH-scFvEGFR(I)-6HIS  
 <400> 116

5

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly  
 35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
 65 70 75 80

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys  
 85 90 95

10

ES 2 653 287 T3

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu  
165 170 175

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp  
180 185 190

Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His  
195 200 205

Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg  
210 215 220

Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu  
225 230 235 240

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp  
245 250 255

Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
260 265 270

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
275 280 285

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
290 295 300

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser  
305 310 315 320

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
325 330 335

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe  
340 345 350

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu

ES 2 653 287 T3

355

360

365

Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu  
370 375 380

Pro Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His His  
385 390 395 400

His His His

5 <210> 117  
<211> 414  
<212> PRT  
<213> pelB-CD3VH-scFvCEA-6HIS  
<400> 117



ES 2 653 287 T3

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 180 185 190

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile  
 195 200 205

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe  
 210 215 220

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 225 230 235 240

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 245 250 255

Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr  
 260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln  
 290 295 300

Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val Thr  
 305 310 315 320

Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln  
 325 330 335

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

Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 355 360 365

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr  
 370 375 380

Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 385 390 395 400

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp His His His His His His  
 405 410

<210> 118  
 <211> 392

<212> PRT  
<213> pelB-CD3VL-scFvCEA-6HIS

<400> 118

5

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Val Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln  
130 135 140

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

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg  
165 170 175

Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser  
180 185 190

Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu  
195 200 205

Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu  
210 215 220

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr  
225 230 235 240

Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
245 250 255



ES 2 653 287 T3

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser  
275 280 285

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn  
290 295 300

Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
305 310 315 320

Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp  
325 330 335

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
340 345 350

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His  
355 360 365

Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
370 375 380

Ala Asp His His His His His His  
385 390

<210> 119  
<211> 414  
<212> PRT  
<213> pelB-(aCD3)VH-scFvHLA-Cw6-myc-6His

5

<400> 119

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly  
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
65 70 75 80

10



ES 2 653 287 T3

340

345

350

Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln  
355 360 365

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asn Phe Asp  
370 375 380

Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu Gln  
385 390 395 400

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
405 410

<210> 120

<211> 391

<212> PRT

<213> pelB-CD3VL-scFvCD138-6His

<400> 120

5

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln  
 130 135 140

Gln Ser Gly Ser Glu Leu Met Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 145 150 155 160

ES 2 653 287 T3

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

Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly  
 180 185 190

Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe  
 195 200 205

Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln Met Gln Leu Ser Ser Leu  
 210 215 220

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gln Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val  
 245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 260 265 270

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala  
 275 280 285

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile  
 290 295 300

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

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 325 330 335

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn  
 340 345 350

Leu Glu Pro Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys  
 355 360 365

Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 370 375 380

Val His His His His His His  
 385 390

<210> 121  
 <211> 408  
 <212> PRT

<213> pelB-CD3VH-scFvCD138-6His

<400> 121

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly  
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
65 70 75 80

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys  
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu  
145 150 155 160

Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Met Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser  
165 170 175

Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu Trp Val  
180 185 190

Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro  
195 200 205

Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr  
210 215 220

Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln Met Gln Leu Ser Ser  
225 230 235 240

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gln Tyr  
245 250 255

ES 2 653 287 T3

Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 260 265 270  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 275 280 285  
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser  
 290 295 300  
 Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val  
 325 330 335  
 Glu Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 340 345 350  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 355 360 365  
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser  
 370 375 380  
 Lys Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Val His His His His His His  
 405

5 <210> 122  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> pelB-(aHis)VH-scFvHLA-A2(VH-VL)-myc  
 <400> 122

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

10



ES 2 653 287 T3

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr  
65 70 75 80

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys  
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
100 105 110

Ser Ser Val Tyr Tyr Cys Glu Ser Gln Ser Gly Ala Tyr Trp Gly Gln  
115 120 125

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val  
145 150 155 160

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr  
165 170 175

Leu Ser Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
180 185 190

Leu Glu Trp Met Ala Phe Ile Arg Asn Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr  
195 200 205

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
210 215 220

Lys Thr Val Ser Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly Pro Leu Asp Tyr Trp  
245 250 255

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val  
275 280 285

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
290 295 300

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
305 310 315 320

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp

ES 2 653 287 T3

325 330 335

Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
340 345 350

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
355 360 365

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr Phe  
370 375 380

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu

5 <210> 123  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> pelB-(aHis)VL-scFvCD45(VL-VH)-myc  
  
<400> 123

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr  
 20 25 30

Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys  
 35 40 45

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 50 55 60

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys  
 65 70 75 80

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 85 90 95

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

Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe  
 115 120 125

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
405 410

5 <210> 124  
<211> 415  
<212> PRT  
<213> pelB-(aCD3)VH-scFvHLA-A2(VH-VL)-myc-6His  
<400> 124

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly  
 35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
 65 70 75 80

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys  
 85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser  
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala  
 165 170 175

Ala Ser Gly Val Thr Leu Ser Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln  
 180 185 190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Ala Phe Ile Arg Asn Asp Gly  
 195 200 205

Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 210 215 220

ES 2 653 287 T3

Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Ser Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg  
 225 230 235 240

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Gly Glu Ser Gly  
 245 250 255

Pro Leu Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val  
 260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 275 280 285

Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 290 295 300

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile  
 305 310 315 320

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 325 330 335

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg  
 340 345 350

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 355 360 365

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser  
 370 375 380

Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Glu  
 385 390 395 400

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
 405 410 415

<210> 125  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> pelB-(aCD3)VL-scFvCD45(VL-VH)-myc-6His  
 <400> 125

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

5

10

ES 2 653 287 T3

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ile Val Leu  
 130 135 140

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

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr  
 165 170 175

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 180 185 190

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu  
 210 215 220

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe  
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Lys Ile Ser Gly Gly  
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gln Val  
 260 265 270

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 275 280 285

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met





ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly  
 35 40 45

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu  
 50 55 60

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

Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 85 90 95

Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp  
 100 105 110

ES 2 653 287 T3

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp  
115 120 125

Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ser Ala Lys Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
165 170 175

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly  
180 185 190

Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
195 200 205

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser  
210 215 220

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe  
225 230 235 240

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
245 250 255

Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
260 265 270

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
290 295 300

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser  
305 310 315 320

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
325 330 335

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val  
340 345 350

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
355 360 365

ES 2 653 287 T3

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His  
370 375 380

Phe Asp His Leu Pro Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
385 390 395 400

Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His  
405 410 415

- <210> 127
- <211> 412
- 5 <212> PRT
- <213> pelB-VLaDIG-scFvEpCAM-myc-6HIS
- <400> 127

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser  
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser  
35 40 45

Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly  
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val  
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr  
85 90 95

Ile Thr Asn Leu Glu Arg Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln  
100 105 110

Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu  
145 150 155 160

Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
165 170 175

Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His  
180 185 190

ES 2 653 287 T3

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His  
 195 200 205

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
 210 215 220

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser  
 225 230 235 240

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp  
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr  
 275 280 285

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met  
 290 295 300

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn  
 305 310 315 320

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu  
 325 330 335

Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr  
 340 345 350

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln  
 355 360 365

Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro  
 370 375 380

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu  
 385 390 395 400

Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
 405 410

5  
 <210> 128  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> pelB-murineCD3VH-scFvEpCAM-6His  
 <400> 128

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly  
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
50 55 60

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

Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn  
85 90 95

Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp  
100 105 110

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Gly  
130 135 140

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

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe  
165 170 175

Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn  
195 200 205

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp  
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly





ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser  
 35 40 45

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr  
 85 90 95

ES 2 653 287 T3

Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ser Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser  
130 135 140

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr  
145 150 155 160

Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile  
165 170 175

Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr  
180 185 190

Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile  
195 200 205

Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
210 215 220

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr  
225 230 235 240

Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp  
260 265 270

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
275 280 285

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu  
290 295 300

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
305 310 315 320

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
325 330 335

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
340 345 350

ES 2 653 287 T3

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu Ala  
355 360 365

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His His His His His  
370 375 380

- <210> 130
- <211> 558
- <212> PRT
- <213> pelB-ta(DIG\*EpCAM)-Myc-6HIS
- <400> 130

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly  
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu  
50 55 60

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

Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
85 90 95

Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp  
100 105 110

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp  
115 120 125

Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Thr  
165 170 175

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg  
180 185 190

Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
195 200 205

ES 2 653 287 T3

Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser  
 210 215 220

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Arg Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys  
 245 250 255

Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 260 265 270

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Gly Gly  
 275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala  
 290 295 300

Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 305 310 315 320

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro  
 325 330 335

Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn  
 340 345 350

Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp  
 355 360 365

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu  
 370 375 380

Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro  
 385 390 395 400

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 405 410 415

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val  
 420 425 430

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val  
 435 440 445

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln  
 450 455 460

ES 2 653 287 T3

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys  
465 470 475 480

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg  
485 490 495

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
500 505 510

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser  
515 520 525

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln  
530 535 540

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
545 550 555

5 <210> 131  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-DIG VL CDR3  
  
<400> 131

10 Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr  
1 5

<210> 132  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> Anti-CD45 VH CDR1  
  
<400> 132

20 Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp  
1 5

<210> 133  
<211> 8  
<212> PRT  
25 <213> Anti-CD45 VH CDR2  
  
<400> 133

30 Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile  
1 5

<210> 134  
<211> 14  
<212> PRT  
35 <213> Anti-CD45 VH CDR3  
  
<400> 134

ES 2 653 287 T3

Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

5 <210> 135  
 <211> 1167  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VL-scFvEPCAM(VH-VL)-6His

<400> 135

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg      60
atggccgaca ttcagctgac ccagctctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcaccatga cctgcagagc cagttcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag      180
tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aagtggcttc tggagtcct      240
tategettca gtggcagtgg gtctgggacc tcatactctc tcacaatcag cagcatggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgocaa cagtggagta gtaacccgct cacgttcggt      360
gctgggacca agctggagct gaaatccgga ggtggtgat ccgaggtgca gctgctogag      420
cagtctggag ctgagctggt aaggcctggg acttcagtga agatatcctg caaggcttot      480
ggatacgcoct tactaacta ctggctaggt tgggtaaagc agaggcctgg acatggactt      540
gagtggattg gagatatttt ccctggaagt ggtaatatcc actacaatga gaagttcaag      600
ggcaaagcca cactgactgc agacaaatct tcgagcacag cctatatgca gctcagtagc      660
ctgacatttg aggactctgc tgtctatttc tgtgcaagac tgaggaactg ggacgagcct      720
atggactact ggggccaagc gaccacggtc accgtctcct caggtggtgg tggttctggc      780
ggcggcggct ccggtggtgg tggttctgag ctctgatga cacagtctcc atcctccctg      840
actgtgacag caggagagaa ggtcactatg agctgcaagt ccagtcagag tctgttaaac      900
agtggaaatc aaaagaacta cttgacctgg taccagcaga aaccagggca gcctcctaaa      960
ctggtgatct actgggcatc cactagggaa tctggggctc ctgatcgctt cacaggcagt     1020
ggatctggaa cagatttcac tctcaccatc agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt     1080
tattactgtc agaatgatta tagttatccg ctcacgttcg gtgctgggac caagcttgag     1140
atcaaacatc atcaccatca tcattag                                           1167
  
```

10  
 15 <210> 136  
 <211> 1215  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VH-scFvHer2/neu-6HIS

<400> 136

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg      120
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa      180
cagaggcctg gacagggctc ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact      240
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca      300
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga      360
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      420
tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctga ggttcagctg      480
gtggagtctg gcggtggcct ggtgcagcca gggggctcac tcogtttgtc ctgtgcagct      540
tctggcttca acattaaaga cacctatata cactgggtgc gtcaggcccc gggtaagggc      600
ctggaatggg ttgcaaggat ttatcctacg aatggttata ctagatatgc cgatagcgtc      660
aagggccggt tcaactataag cgcagacaca tccaaaaaca cagcctacct gcagatgaac      720
agcctgogtg ctgaggacac tgccgtctat tattgttcta ggtggggagg ggacggcttc      780
tatgctatgg actattgggg tcaaggaacc ctggctactg tctcctcogg tgggtggtgt      840
tctggcggcg gcggtccogg tgggtggtgt tctgatatcc agatgacca gtccccgagc      900
tcctgtccg cctctgtggg cgatagggtc accatcacct gccgtgccag tcaggatgtg      960
aactactgtg tagcctggta tcaacagaaa ccaggaaaag ctccgaaact actgatttac     1020
tcggcatcct tcctctactc tggagtccct tctcgttct ctggatccag atctgggacg     1080
gatttcactc tgaccatcag cagtctgcag cgggaagact tcgcaactta ttactgtcag     1140
caacattata ctactcctcc cacgttcgga caggtacca aggtggagat caaacatcat     1200
caccatcatc attag                                     1215

```

5 <210> 137  
 <211> 1212  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VH-scFvEGFR (1) -6HIS

10 <400> 137



ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgotgc tctctgctgc ccagccggcg      60
atggccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg      120
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa      180
cagaggcctg gacaggtct ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact      240
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca      300
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga      360
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      420
tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccgggtggg gtggttctca ggtgcagctg      480
caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct toggagacc tgtccctcac ctgcactgtc      540
tctgggtggc ccgtcagcag tggtgattac tactggacct ggatccggca gtccccaggg      600
aagggactgg agtggattgg acacatctat tacagtggga acaccaatta taaccctcc      660
ctcaagagcc gactcaccat atcaattgac acgtocaaga ctcagttctc cctgaagctg      720
agttctgtga ccgctgccga cacggccatt tattactgtg tgcgagatcg agtgactgg      780
gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttccggtg tggtggttct      840
ggcggcggcg gctccggtg tggtggttct gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc      900
ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc atcacttgc aggcgagtca ggacatcagc      960
aactatttaa attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaaactcct gatctaogat     1020
gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat     1080
ttactttca ccatcagcag cctgcagcct gaagatattg caacatattt ctgtcaaacac     1140
ttgatcatc tcccgctcgc tttcggcggg gggaccaagg tggagatcaa acatcatcac     1200
catcatcatt ag                                                                1212

```

- 5 <210> 138
- <211> 1245
- <212> ADN
- <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VH-scFvCEA-6HIS
- 10 <400> 138

ES 2 653 287 T3

atgaaatacc tgctgocgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccgocg	60
atggccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggccctcagtg	120
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa	180
cagaggcctg gacagggctc ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact	240
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca	300
gcctacatgc aactgagcag octgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga	360
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	420
tcaggtggtg gtggttctgg cggggcgggc tccggtggtg gtggttcttc tagagtggcc	480
caggtgcaac tgcagcagtc aggggctgag ctggctagac ctggggcttc agtgaagatg	540
tcctgcaagg cttctggcta cacctttact acctacacaa tacactgggt aagacagagg	600
cctggacaag atctggaatg gattggatac attaatccta gcagtggata ttctgactac	660
aatcaaaact tcaagggcaa gaccacattg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac	720
atgcaactga acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagagcg	780
gactatggta actacgaata tacctggttt gcttactggg gccaaaggac cacggtcacc	840
gtctcctcag gtggaggcgg ttcagggcga ggtggctctg gcgggtggcg atcggacatc	900
gagctcactc agtctccaaa attcatgtcc acatcagtag gagacagggc caacgtcacc	960
tacaaggcca gtcagaatgt gggactaat gtagcctggt ttcaacaaaa accagggcaa	1020
tctcctaaag ttctgattta ctggcatct tacogataca gtggagtccc tgatcgcttc	1080
acaggcagtg gatctggaac agatttact ctcaccatca gcaatgtgca gtctgaagac	1140
ttggcagagt atttctgtca gcaatatcac acctatctc tcacgttcgg agggggcacc	1200
aagctggaaa tcaaacgggc ggatcatcat caccatcacc attag	1245

- 5 <210> 139
- <211> 1179
- <212> ADN
- <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VL-scFvCEA-6HIS
- 10 <400> 139

ES 2 653 287 T3

atgaaatacc tgctgocgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
atggccgaca ttcagotgac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120  
gtcaccatga cctgcagagc cagttcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag 180  
tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aagtggcttc tggagtccct 240  
tatcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcatactctc tcacaatcag cagcatggag 300  
gctgaagatg ctgccactta ttactgcca cagtggagta gtaaccgct cacgttcggt 360  
gctgggacca agctggagct gaaatccgga ggtggtgat cctctagagt ggcccagggt 420  
caactgcagc agtcaggggc tgagctggct agacctggg ottcagtga gatgtcctgc 480  
aaggcttctg gctacacctt tactacctac acaatacact gggtaagaca gaggcctgga 540  
cacgatctgg aatggattgg atacattaat cctagcagtg gatattctga ctacaatcaa 600  
aacttcaagg gcaagaccac attgactgca gacaagtctt ccaacacagc ctacatgcaa 660  
ctgaacagcc tgacatctga ggactctgcg gtctattact gtgcaagaag agcggactat 720  
ggtaactacg aatatacctg gtttgcttac tggggccaag ggaccacggt cacogtctcc 780  
tcagggtggag gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcgga catcgagctc 840  
actcagtctc caaaattcat gtccacatca gtaggagaca gggtaacgt cacctacaag 900  
gccagtcaga atgtgggtac taatgtagcc tggtttcaac aaaaaccagg gcaatctcct 960  
aaagttctga ttactcggc atcttaccga tacagtggag tcctgatcg cttcacaggc 1020  
agtggatctg gaacagattt cactctcacc atcagcaatg tgcagtctga agacttggca 1080  
gagtatttct gtcagcaata tcacacctat cctctcagct tcggaggggg caccaagctg 1140  
gaaatcaaac gggcggatca tcatcaccat catcattag 1179

<210> 140

<211> 1245

5

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-(aCD3)VH-scFvHLA-Cw6-myc-6His

<400> 140

atgaaatacc tgctgocgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
atggccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg gccctcagtg 120  
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa 180  
cagaggcctg gacagggctt ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact 240  
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca 300

10

ES 2 653 287 T3

```

gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga      360
tattatgatg atcattactg cottgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      420
tcaggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc agcggcggcg aagtgcagct ggtggaaagc      480
ggcggcggcc tggcgcagcc gggcggcagc ctgcgcctga gctgcgcggc gagcggcttt      540
accttagca gctatgcgat gagctgggtg cgccagggcg cgggcaaagg cctggaatgg      600
gtgagcgcga ttagcggcag cggcggcagc acctattatg cggatagcgt gaaaggccgc      660
tttaccatta gccgcgataa cagcaaaaac acctgtatc tgcagatgaa cagcctgcgc      720
goggaagata ccgcggtgta ttattgcgcg cgctatagct ttagctggtt tgatgtgtgg      780
ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc gcgggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc      840
ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc gatattgaac tgaccagcc gccgagcgtg      900
agcgtggcgc cgggccagac cgcgcgcat agctgcagcg gcgatgcgct gggcgataaa      960
tatgagagct ggtatcagca gaaaccgggc caggcgcggg tgctggtgat ttatgatgat     1020
agcgatcgcc cgagcggcat tccggaacgc ttagcggca gcaacagcgg caacaccgcg     1080
accctgacca ttagcggcac ccaggcggaa gatgaagcgg attattattg ccagagctat     1140
gataactttg atagcccggt gtttggcggc ggcaaccaaac tgaccgtgct gggcgaacaa     1200
aaactcatct cagaagagga tctgcatcat caccatcatc attag                          1245

```

<210> 141

<211> 1176

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VL-scFvCD138-6His

<400> 141

5

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgaca ttcagctgac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctoc aggggagaag      120
gtcaccatga cctgcagagc cagttcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag      180
tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt      240
tategcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcatactctc tcacaatcag cagcatggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgcca cagtggagta gtaaccgct cacttcggg      360
gctgggacca agctggagct gaaatccgga ggtggtggat ccggaggtgg tggatccag      420
gtgcagctgc agcagagcgg cagcgaactg atgccggcg cgagcgtgaa aattagctgc      480
aaagcgaccg gctatacctt tagcaactat tggattgaat ggtgaaaca gcgccgggc      540
catggcctgg aatggattgg cgaaattctg ccgggcaccg gccgcacat ttataacgaa      600
aaatttaaag gcaagcgac ctttaccgcg gatattagca gcaacacgt gcagatgcag      660
ctgagcagcc tgaccagcga agatagcgcg gtgtattatt gcgcgcgoga acagtattat      720
ggcaactttt attatgcgat ggattattgg ggccagggca ccagcgtgac cgtgagcagc      780

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcgatat tcagatgacc      840
cagagcacca gcagcctgag cgogagcctg ggcgatcgcg tgaccattag ctgcagcgcg      900
agccagggca ttaacaacta tctgaactgg tateagcaga aaccggatgg caccgtggaa      960
ctgctgattt attataccag caccctgcag agcggcgtgc cgagccgctt tagcggcagc     1020
ggcagcggca ccgattatag cctgaccatt agcaacctgg aaccggaaga tattggcacc     1080
tattattgcc agcagtatag caaactgccg cgcacctttg gcggcggcac caaactggaa     1140
attaacgca ccgtgcatca tcaccatcat cattag                                     1176

```

- 5 <210> 142
- <211> 1227
- <212> ADN
- <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3VH-scFvCD138-6His
- 10 <400> 142

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg      60
atggccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggctcagtg      120
aagatgtctc gcaagacttc tggctacacc tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa      180
cagaggcctg gacagggctc ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact      240
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca      300
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga      360
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      420
tcaggtgggt gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctca ggtgcagctg      480
cagcagagcg gcagcgaact gatgccgggc gcgagcgtga aaattagctg caaagcgacc      540
ggctatacct ttagcaacta ttggattgaa tgggtgaaac agcgcccggg ccatggcctg      600
gaatggattg gcgaaattct gccgggcacc ggccgcacca tttataacga aaaatttaaa      660
ggcaaagcga cctttaccgc ggatattagc agcaacaccg tgcagatgca gctgagcagc      720
ctgaccagcg aagatagcgc ggtgtattat tgccgcgcgc aacagtatta tggcaacttt      780
tattatgcga tggattattg gggccagggc accagcgtga ccgtgagcag cggcggcggc      840
ggcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcgata ttcagatgac ccagagcacc      900
agcagcctga gcgcgagcct gggcgatcgc gtgaccatta gctgcagcgc gagccagggc      960
attaacaact atctgaactg gtatcagcag aaaccggatg gcaccgtgga actgctgatt     1020
tattatacca gcaccctgca gagcggcgtg ccgagccgct ttagcggcag cggcagcggc     1080
accgattata gcctgacat tagcaacctg gaaccggaag atattggcac ctattattgc     1140
cagcagtata gcaaactgcc gcgcaccttt ggcgcgcgca ccaaactgga aattaaacgc     1200
accgtgcatc atcaccatca tcattag                                     1227

```

<210> 143

<211> 1212

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-(aHis)VH-scFvHliA-A2(VH-VL)-myc

<400> 143

5

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggcccagg tgcagctgca gcagagcggc cgggaagatg tgaaaccggg cgcgagcgtg      120
aaaattagct gcaaagcgag cggctataacc tttaccgatt attatatgaa ctgggtgaaa      180
cagagcccg gcaaaggcct ggaatggatt ggcgatatta acccgaacaa cggcggcacc      240
agctataacc agaaatttaa aggccgcgcg accctgaccg tggataaaag cagcagcacc      300
gcgtatatgg aactgcgag cctgaccagc gaagatagca gcgtgtatta ttgcgaaagc      360
cagagcggcg cgtattgggg ccagggcacc accctgaccg tgagcggggg cggcggcggc      420
agcggcggcg gcggcagcgg cggccagggtg cagctggtgc agtctggggg aggcgtggtc      480
cagcctgggg ggtcctgag agtctcctgt gcagcgtctg gggtcaccct cagtgattat      540
ggcatgcatt gggccgcca ggctccaggc aaggggotgg agtggatggc tttatacgg      600
aatgatgaa gtgataaata ttatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga      660
gacaactcca agaaaacagt gtctctgcaa atgagcagtc tcagagctga agacacggct      720
gtgtattact gtgcgaaaaa tggcgaatct gggcctttgg actactggta cttcgatctc      780
tggggccgtg gcaccctggt caccgtgtcg agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggc      840
tctggcggtg gcggatcgga tgttgtgatg actcagtctc catcctcctt gtctgcatct      900
gtaggagaca gagtcaacct cacttgccag gcgagtcagg acattagcaa ctatttaa      960
tggtatcagc agaaaccagg gaaagccct aagctcctga tctacgatgc atccaattg      1020
gaaacagggg tcccatcaag gttcagtgga agtggatctg ggacagattt tactttcacc      1080
atcagcagcc tgcagcctga ggatthtgca acttattact gccacaata tagtagtttt      1140
ccgctcactt tcggcggagg gaccaaagtg gatatcaaac gtgaacaaaa actcatctca      1200
gaagaggatc tg                                     1212

```

<210> 144

<211> 1230

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-(aHis)VL-scFvCD45(VL-VH)-myc

<400> 144

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgatt ataaagatat tctgatgacc cagacccoga gcagcctgcc ggtgagcctg      120
ggcgtacagc cgagcattag ctgcgcgagc agccagagca ttgtgcatag caacggcaac      180
acctatctgg aatggtatct gcagaaaccg ggccagagcc cgaaactgct gatttataaa      240
gtgagcaacc gctttagcgg cgtgccggat cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat      300

```

5

10

ES 2 653 287 T3

tttaccctga aaattagccg cgtggaagcg gaagatctgg gcgtgtatta ttgctttcag	360
ggcagccatg tgccgtttac ctttggcagc ggcaacaaac tggaaattaa acgcggcggc	420
ggcggcagcg gcggcggcgg cagcggcggc gatattgttc tgaccagag cccggcgagc	480
ctggcgggta gcctgggtca gcgtgccacc attagctgcc gtgcgagcaa aagcgtgagc	540
accagcggct atagctatct gcattggtat cagcagaaac cgggccagcc tccaaaactg	600
ctgatttato tggccagcaa cctggaaagc ggtgtgccgg cccgttttag cggcagcggc	660
agcggtagcg attttaccct gaacattcat ccggtggaag aagaagatgc ggcgacctat	720
tattgocagc atagccgtga actgccgttt acctttggca gcggcaccaa actggaaatt	780
aaaaagatct ctggtggcgg cggtcgggt ggtggtgggt cgggcggcgg cggtcagc	840
caggtgcagc tgggtgaaag cgggtggcga ctggtgcagc cgggcggcag cctgaaactg	900
agctgtgccg ccagcgggtt tgattttagc cgttattgga tgagctgggt gcgtcagcgg	960
ccgggcaaag gcctggaatg gattggcga attaacccga ccagcagcac cattaacttt	1020
accccgagcc tgaaagataa agtgtttatt agccgtgata acgcgaaaaa caccctgtat	1080
ctgcagatga gcaaagtgcg tagogaagat accgcgctgt attattgcgc gcgtggcaac	1140
tattatcgtt atggcgatgc gatggattat tggggccagg gcaccagcgt gaccgtgagc	1200
gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg	1230

<210> 145

<211> 1248

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-(aCD3)VH-scFvHliA-A2(VH-VL)-myc-6His

<400> 145

5



ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgata tcaaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg      120
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa      180
cagaggcctg gacagggctt ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tgggtatact      240
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca      300
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga      360
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      420
tcaggggcgg gcggcagcgg cggcggcggc agcggcggcc aggtgcagct ggtgcagctc      480
gggggagggc tggctcagcc tggggggtcc ctgagagtct cctgtgcagc gtctggggtc      540
acctcagtg attatggcat gcattgggtc cgccaggctc caggcaaggg gctggagtgg      600
atggctttta tacggaatga tggaaagtgat aaatattatg cagactccgt gaagggccga      660
ttcaccatct ccagagacaa ctccaagaaa acagtgtctc tgcaaatgag cagtctcaga      720
gctgaagaca cggctgtgta ttactgtgcy aaaaatggcg aatctgggcc tttggactac      780
tggctacttc atctctgggg ccgtggcacc ctggtcaccg tgctcagtggt tggagggcgt      840
tcaggcggag gtggctctgg cggtgggcga tcggatggtg tgatgactca gtctccatcc      900
tcctgtctg catctgtagg agacagagtc accatcactt gccaggcgag tcaggacatt      960
agcaactatt taaattggta tcagcagaaa ccagggaaag ccctaagct cctgatctac     1020
gatgcatoca atttggaac aggggtccca tcaaggttca gtggaagtgg atctgggaca     1080
gattttactt tcaccatcag cagcctgcag cctgaggatt ttgcaacta ttactgcca     1140
caatatagta gttttccgct cactttcggc ggagggacca aagtggatat caaacgtgaa     1200
caaaaactca tctcagaaga ggatctgcat catcaccatc atcattag                       1248

```

5 <210> 146  
 <211> 1221  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-(aCD3)VL-scFvCD45(VL-VH)-myc-6His

10 <400> 146

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc toctcgctgc ccagccggcg      60
atggccgaca ttcagctgac ccagtcctca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcaccatga cctgcagagc cagttcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag      180
tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aagtggcttc tggagtccct      240
tatcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcatactctc tcacaatcag cagcatggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccaa cagtggagta gtaaccgctc cacgttcggt      360
gctgggacca agctggagct gaaaggcggc ggccggcagcg gccggcggcg cagcggcggc      420
gatattgttc tgaccagagc cccggogagc ctggcgggta gcctgggtca gcgtgccacc      480
attagctgcc gtgcgagcaa aagcgtgagc accagcggct atagctatct gcattggtat      540
cagcagaaac cgggccagcc tccaaaactg ctgatttata tggccagcaa cctggaaagc      600
ggtgtgccgg cccgttttag cggcagcggc agcgggtaccg attttaccct gaacattcat      660
ccggtggaag aagaagatgc ggcgacctat tattgccagc atagccgtga actgccgttt      720
acctttggca gcggcaccaa actggaaatt aaaaagatct ctggtggcgg cggctcgggt      780
ggtggtgggt cgggcggcgg cggctcagac caggtgcagc tgggtgaaag cgggtggcga      840
ctggtgcagc cgggcggcag cctgaaactg agctgtgccg ccagcgggtt tgattttagc      900
cgttattgga tgagctgggt gcgtcaggcg ccgggcaaag gcctggaatg gattggcga      960
attaaccoga ccagcagcac cattaacttt accccgagcc tgaaagataa agtgtttatt      1020
agccgtgata acgcgaaaaa cacctgtat ctgcagatga gcaaagtgcg tagcgaagat      1080
accgcgctgt attattgcgc gcgtggcaac tattatcgtt atggcgatgc gatggattat      1140
tggggccagg gcaccagcgt gaccgtgagc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg      1200
catcatcacc atcatcatta g                                             1221

```

<210> 147

<211> 1248

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-VHaDIG-scFvEGFR-FLAG-6HIS

<400> 147

5

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 atggccgaag tgcagctggt ggaaagcggc ggcggcctgg tgaaaccggg cggcagcctg 120  
 aaactgagct gcgcggtgag cggctttacc tttagcgatt atgcgatgag ctggattcgc 180  
 cagaccccg gaaaaccgcct ggaatgggtg gcgagcatta acattggcgc gacctatgcg 240  
 tattatccgg atagcgtgaa aggcgcgttt accattagcc gcgataacgc gaaaaacacc 300  
 ctgtttctgc agatgagcag cctgggcagc gaagataccg cgatgtatta ttgcgcgcgc 360  
 ccgggcagcc cgtatgaata tgataaagcg tattatagca tggcgtattg gggcccgggc 420  
 accagcgtga ccgtgagcag cgcgaaaacc ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc 480  
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctcggagac cctgtccctc 540  
 acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggac ctggatccgg 600  
 cagtccccag ggaagggact ggagtggatt ggacacatct attacagtgg gaacaccaat 660  
 tataaccct ccctcaagag ccgactcacc atatcaattg acacgtcca gactcagttc 720  
 tcctgaagc tgagttctgt gaccgctgcg gacacggcca tttattactg tgtgcgagat 780  
 cgagtgactg gtgcttttga tatctggggc caagggacaa tggtcacogt ctcttccggt 840  
 ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctgacatcca gatgaccag 900  
 tctccatcct ccctgtctgc atctgtcggg gacagagtca ccatcacttg ccaggcgagt 960  
 caggacatca gcaactatth aaattggtat cagcagaaac cagggaaagc ccctaaactc 1020  
 ctgatctacg atgcatccaa tttggaaaca ggggtcccat caaggttcag tggaaagtga 1080  
 tctgggacag attttacttt caccatcagc agcctgcagc ctgaagatat tgcaacatat 1140  
 ttctgtcaac actttgatca tctccogctc gctttcggcg gagggaccaa ggtggagatc 1200  
 aaagactaca aggatgacga tgacaaacat catcaccatc atcattag 1248

<210> 148

<211> 1239

5

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-VLaDIG-scFvEpCAM-myc-6HIS

<400> 148

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 atggccgatg tgcagatgac ccagagcacc agcagcctga gcgcgagcct gggcgatcgc 120  
 gtgaccatta gctgccgcgc gagccaggat attaaaaact atctgaactg gtatcagcag 180  
 aaaccggcgg gcacogtgaa actgctgatt tattatagca gcaccctgct gagcggcgtg 240  
 ccgagccgct tttagcggccg cggcagcggc accgatttta gcctgacat taccaacctg 300

10

ES 2 653 287 T3

gaacgcgaag atattgcgac ctatTTTTgc cagcagagca ttaccctgcc gccgaccttt 360  
 ggcggcggca ccaaactgga aattaaacgc gcggatgctg cgcgcacogt gagcattttt 420  
 ggtggttccg gaggtggtgg atccgaggtg cagctgctcg agcagtctgg agctgagctg 480  
 gtaaggcctg ggacttcagt gaagatatcc tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaac 540  
 tactggctag gttgggtaaa gcagaggcct ggacatggac ttgagtggat tggagatatt 600  
 ttccctggaa gtggtaatat ccaactacaat gagaagttca agggcaaagc cacactgact 660  
 gcagacaaat cttcgagcac agcctatatg cagctcagta gcctgacatt tgaggactct 720  
 gctgtctatt tctgtgcaag actgaggaac tgggacgagc ctatggacta ctggggccaa 780  
 gggaccacgg tcaccgtctc ctccaggtgtt ggtggttctg gcggcggcgg ctccgggtgtt 840  
 ggtggttctg agctcgtgat gacacagtct ccatoctccc tgactgtgac agcaggagag 900  
 aaggtcacta tgagctgcaa gtccagtcag agtctgttaa acagtggaaa tcaaagaac 960  
 taactgacct ggtaccagca gaaaccaggg cagcctccta aactgttgat ctactgggca 1020  
 tccactaggg aatctgggtt ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg aacagatttc 1080  
 actotcacca tcagcagtgt gcaggctgaa gaocctggcag tttattactg tcagaatgat 1140  
 tatagttatc cgctcacggt cggctgctggg accaagcttg agatcaaaga acagaaactg 1200  
 atctctgaag aagacctgca tcatcaccat catcattag 1239

<210> 149

<211> 1203

5 <212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-murineCD3VH-scFvEpCaAM-6His

<400> 149

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatc tgctgccgac cgcggcggcg ggccctgctgc tgctggcggc gcagccggcg      60
atggcggaag tgcagctggt ggaaagcggc ggccggcctgg tgcagccggg caaaagcctg      120
aaactgagct gcgaagcgag cggctttacc tttagecggct atggcatgca ttgggtgcgc      180
caggogccgg gccgcggcct ggaaagcgtg gcgtatatta ccagcagcag cattaacatt      240
aaatatgcgg atgcggtgaa aggcgcgctt accgtgagcc gcgataacgc gaaaaacctg      300
ctgtttctgc agatgaacat tctgaaaagc gaagataccg cgatgtatta ttgocgocgc      360
tttgattggg ataaaaacta ttggggccag ggcacccatgg tgaccctgag cagcgcgaaa      420
accagcagcg gcggcggcga ggtgcagctg ctcgagcagt ctggagctga gctggtaagg      480
cctgggactt cagtgaagat atcctgcaag gcttctggat acgccttcac taactactgg      540
ctaggttggg taaagcagag gcctggacat ggacttgagt ggattggaga tattttcctt      600
ggaagtggta atatccacta caatgagaag ttcaaggga aagccacact gactgcagac      660
aaatcttcga gcacagccta tatgcagctc agtagcctga catttgagga ctctgctgtc      720
tatttctgtg caagactgag gaactgggac gagcctatgg actactgggg ccaagggacc      780

acggtcaccg tctcctcagg tggtggtggt tctggcggcg gcggtccgg tggtggtggt      840
tctgagctcg tgatgacaca gtctccatcc tcctgactg tgacagcagg agagaaggtc      900
actatgagct gcaagtccag tcagagtctg ttaaaccagt gaaatcaaaa gaactacttg      960
acctggtacc agcagaaacc aggcagcctt octaaactgt tgatctactg ggcattccact     1020
agggaatctg ggtccctga tcgcttcaca ggcagtgat ctggaacaga tttactctc     1080
accatcagca gtgtgcaggc tgaagacctg gcagtttatt actgtcagaa tgattatagt     1140
tatccgctca cgttcgggtc tgggaccaag cttgagatca aacatcatca ccatcatcat     1200
tag                                                                           1203

```

<210> 150

5 <211> 1155

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-murineCD3VL-scFvEGFR-6His

<400> 150

10

ES 2 653 287 T3

```

atgaaatatac tgctgccgac cgcggcggcg ggcoctgctgc tgctggcggc gcagccggcg      60
atggcgggata ttcagatgac ccagagcccg agcagcctgc cggcgagcct gggcgatcgc      120
gtgaccatta  actgccaggc gagccaggat attagcaact atctgaactg gtatcagcag      180
aaaccggggca aagcggccgaa actgctgatt tattatacca acaaactggc ggatggcgtg      240
ccgagccgct  ttagcggcag cggcagcggc cgcgatagca gctttacat tagcagcctg      300
gaaagcgaag atattggcag ctattattgc cagcagtatt ataactatcc gtggacottt      360
ggcccggggca ccaaactgga aattaaacgc gcggatagca gcggcggcgg ccaggtgcag      420
ctgcaggagt  cgggcccagc actggtgaag ccttoggaga ccctgtccct cacctgcaact      480
gtctctggtg  gctccgtcag cagtggatg tactactgga cctggatccg gcagtcccca      540
gggaagggac  tggagtggat tggacacatc tattacagtg ggaacaccaa ttataacccc      600
tccctcaaga  gccgactcac catatcaatt gacacgtcca agactcagtt ctccctgaag      660
ctgagttctg  tgaccgctgc ggacacggcc atttattact gtgtgcgaga tcgagtgact      720
ggtgcttttg  atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcggg tgggtggtggt      780
totggcggcg  gcggctccgg tgggtggtggt tctgacatcc agatgaccca gtctccatcc      840
tccctgtctg  catctgtcgg agacagagtc accatcactt gccaggcgag tcaggacatc      900
agcaactatt  taaattggta tcagcagaaa ccagggaaag ccctaaact cctgatctac      960
gatgcatcca  atttgaaac aggggtccca tcaaggttca gtggaagtgg atctgggaca      1020
gattttactt  tcaccatcag cagcctgcag cctgaagata ttgcaacata tttctgtcaa      1080
cactttgato  atctccgct  cgctttcggc ggagggacca aggtggagat caaacatcat      1140
caccatcato  attag                                           1155

```

<210> 151

<211> 1677

<212> ADN

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-ta(DIG\*EpCAM)-Myc-6HIS

<400> 151

5

ES 2 653 287 T3

atgaaatacc	tgctgccgac	cgctgctgct	ggtctgctgc	tctctgctgc	ccagccggcg	60
atggccgaag	tgcaagctggt	ggaaagcggc	ggcggcctgg	tgaaaccggg	cggcagcctg	120
aaaotgagct	gcgcgggtgag	cggtctttacc	tttagcgatt	atgogatgag	ctggattcgc	180
cagaccccg	aaaaccgcct	ggaatgggtg	gcgagcatta	acattggcgc	gacctatgog	240
tattatccgg	atagcgtgaa	aggccgcttt	accattagcc	gcgataacgc	gaaaaacacc	300
ctgtttctgc	agatgagcag	cctgggcagc	gaagataaccg	cgatgtatta	ttgcgcgcgc	360
ccgggcagcc	cgtatgaata	tgataaagcg	tattatagca	tggcgtattg	gggcccgggc	420
accagcgtga	ccgtgagcag	cgcgaaaacc	tctctcaggtg	gtggtggttc	tggcggcggc	480
ggctccgggtg	gtggtggttc	tggtgatgtg	cagatgacc	agagcaccag	cagcctgagc	540
gogagcctgg	gcgatcgcgt	gaccattagc	tgccgcgcga	gccaggatat	taaaaactat	600
ctgaactggt	atcagcagaa	accgggcggc	accgtgaaac	tgctgattta	ttatagcagc	660
accctgctga	gcggcgtgcc	gagccgcttt	agcggcccg	gcagcggcac	cgatttttagc	720
ctgaccatta	ccaacctgga	acgcgaagat	attgcgacct	atTTTTGCCA	gcagagcatt	780
accctgccgc	cgacctttgg	cggcggcacc	aaactggaaa	ttaaaccgcgc	ggatgcggcg	840
ccgaccgtga	gcatttttgg	tggttccgga	ggtggtggat	ccgaggtgca	gctgctcgag	900
cagtctggag	ctgagctggt	aaggcctggg	acttcagtga	agatatacctg	caaggcttct	960
ggatacgcct	tactaacta	ctggctaggt	tgggtaaagc	agaggcctgg	acatggactt	1020
gagtggattg	gagatatttt	ccctggaagt	ggtaatatcc	actacaatga	gaagttcaag	1080
ggcaaagcca	cactgactgc	agacaaatct	tcgagcacag	cctatatgca	gctcagtagc	1140
ctgacatttg	aggactctgc	tgtctatttc	tgtgcaagac	tgaggaactg	ggacgagcct	1200
atggactact	ggggccaagg	gaccaoggtc	accgtctcct	caggtggtgg	tggttctggc	1260
ggcggcggct	ccggtggtgg	tggttctgag	ctcgtgatga	cacagtctcc	atcctcctg	1320
actgtgacag	caggagagaa	ggtcactatg	agctgcaagt	ccagtcagag	tctgttaaac	1380
agtggaaatc	aaaagaacta	cttgacctgg	taccagcaga	aaccagggca	gcctcctaaa	1440
ctgttgatct	actgggcctc	cactagggaa	tctggggctc	ctgatcgctt	cacaggcagt	1500
ggatctggaa	cagatttcac	tctcaccatc	agcagtgctgc	aggctgaaga	cctggcagtt	1560
tattactgtc	agaatgatta	tagttatccg	ctcaogttog	gtgctgggac	caagcttgag	1620
atcaaagaac	agaaactgat	ctctgaagaa	gacctgcctc	atcaccatca	tcattag	1677

<210> 152  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD19 VH

5

<400> 152

ES 2 653 287 T3

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

<210> 153  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Anti-CD19 VL

5

<400> 153

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

10



ES 2 653 287 T3

85

90

95

**Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser**  
100 105 110

5

<210> 154

<211> 251

<212> PRT

<213> scFv anti CD19 (VH-conector-VL)

<400> 154

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

<210> 155  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD19 VH CDR1  
5  
<400> 155

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp  
1 5

<210> 156  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Anti-CD19 VH CDR2  
15  
<400> 156

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr  
1 5

<210> 157  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Anti-CD19 VH CDR3  
20  
<400> 157

25  
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
1 5 10 15  
Tyr

<210> 158  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Anti-CD19 VL CDR1  
30  
<400> 158

35  
Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr  
1 5 10

<210> 159  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Anti-CD19 VL CDR3  
40  
<400> 159

45  
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr  
1 5

<210> 160  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> Componente Ia de la toxina de *Clostridium perfringens lota* (a.a.23-454) 6x etiqueta de histidina en dos  
50 sitios de escisión de proteasa  
<400> 160

ES 2 653 287 T3

Met Ala Ser Thr Thr His His His His His His Asp Thr Asp Ile Pro  
1 5 10 15

Thr Thr Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Asp Asp Asp Lys Glu Asn Leu  
20 25 30

Tyr Phe Gln Gly His Met Ala Phe Ile Glu Arg Pro Glu Asp Phe Leu  
35 40 45

Lys Asp Lys Glu Asn Ala Ile Gln Trp Glu Lys Lys Glu Ala Glu Arg  
50 55 60

Val Glu Lys Asn Leu Asp Thr Leu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Leu Tyr  
65 70 75 80

Lys Lys Asp Ser Glu Gln Ile Ser Asn Tyr Ser Gln Thr Arg Gln Tyr  
85 90 95

Phe Tyr Asp Tyr Gln Ile Glu Ser Asn Pro Arg Glu Lys Glu Tyr Lys  
100 105 110

Asn Leu Arg Asn Ala Ile Ser Lys Asn Lys Ile Asp Lys Pro Ile Asn  
115 120 125

Val Tyr Tyr Phe Glu Ser Pro Glu Lys Phe Ala Phe Asn Lys Glu Ile  
130 135 140

Arg Thr Glu Asn Gln Asn Glu Ile Ser Leu Glu Lys Phe Asn Glu Leu  
145 150 155 160

Lys Glu Thr Ile Gln Asp Lys Leu Phe Lys Gln Asp Gly Phe Lys Asp  
165 170 175

Val Ser Leu Tyr Glu Pro Gly Asn Gly Asp Glu Lys Pro Thr Pro Leu  
180 185 190

Leu Ile His Leu Lys Leu Pro Lys Asn Thr Gly Met Leu Pro Tyr Ile  
195 200 205

ES 2 653 287 T3

Asn Ser Asn Asp Val Lys Thr Leu Ile Glu Gln Asp Tyr Ser Ile Lys  
 210 215 220

Ile Asp Lys Ile Val Arg Ile Val Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Ile Lys  
 225 230 235 240

Ala Glu Ala Ser Ile Val Asn Ser Leu Asp Phe Lys Asp Asp Val Ser  
 245 250 255

Lys Gly Asp Leu Trp Gly Lys Glu Asn Tyr Ser Asp Trp Ser Asn Lys  
 260 265 270

Leu Thr Pro Asn Glu Leu Ala Asp Val Asn Asp Tyr Met Arg Gly Gly  
 275 280 285

Tyr Thr Ala Ile Asn Asn Tyr Leu Ile Ser Asn Gly Pro Leu Asn Asn  
 290 295 300

Pro Asn Pro Glu Leu Asp Ser Lys Val Asn Asn Ile Glu Asn Ala Leu  
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ser Asn Leu Ile Val Tyr Arg Arg Ser Gly  
 325 330 335

Pro Gln Glu Phe Gly Leu Thr Leu Thr Ser Pro Glu Tyr Asp Phe Asn  
 340 345 350

Lys Ile Glu Asn Ile Asp Ala Phe Lys Glu Lys Trp Glu Gly Lys Val  
 355 360 365

Ile Thr Tyr Pro Asn Phe Ile Ser Thr Ser Ile Gly Ser Val Asn Met  
 370 375 380

Ser Ala Phe Ala Lys Arg Lys Ile Ile Leu Arg Ile Asn Ile Pro Lys  
 385 390 395 400

Asp Ser Pro Gly Ala Tyr Leu Ser Ala Ile Pro Gly Tyr Ala Gly Glu  
 405 410 415

Tyr Glu Val Leu Leu Asn His Gly Ser Lys Phe Lys Ile Asn Lys Val  
 420 425 430

Asp Ser Tyr Lys Asp Gly Thr Val Thr Lys Leu Ile Leu Asp Ala Thr  
 435 440 445

Leu Ile Asn  
 450

## ES 2 653 287 T3

<210> 161

<211> 300

<212> PRT

5 <213> subunidad A de la toxina Shiga de *Burkholderia* sp. CCGE1002 (a.a.24-285) 6x etiqueta de histidina en dos sitios de escisión de proteasa

<400> 161

ES 2 653 287 T3

Met Ala Ser Thr Thr His His His His His His Asp Thr Asp Ile Pro  
1 5 10 15

Thr Thr Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Asp Asp Asp Lys Glu Asn Leu  
20 25 30

Tyr Phe Gln Gly His Met Glu Phe Ser Val Asp Phe Thr Ser Pro Gln  
35 40 45

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

Met Ser Leu Thr Asn Ile Pro Gly Asn Lys Ile Leu Tyr Gln Leu Arg  
65 70 75 80

Pro Asp Ala Ser Asn Ile Val Glu Gly Val Thr Ile Glu Ile Ile Gly  
85 90 95

Val Gly Arg Asn Asn Ser Pro Ser Asn Arg Asp Val Arg Phe Val Ile  
100 105 110

Asn Pro Ser Asp Leu Tyr Leu Thr Gly Phe Ile Val Gly Arg Ile Phe  
115 120 125

Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser Asp Thr Ala Ser Gly Arg Val Gln Val  
130 135 140

Asn Ala Pro Arg His Leu Val Asp Phe Thr Ile Asp Met Thr Val Asp  
145 150 155 160

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Ala Arg Ser Ala Gly Val Ser Ala Asp Arg  
165 170 175

Thr Asp Leu Ser Ile Asp Arg Tyr Ser Leu Met Lys Gly Tyr Arg Asp  
180 185 190

Leu Ile Asn His Val Ser Ser Thr Arg Thr Ile Asn Gly Ala Glu Ala  
195 200 205

Arg Ala Leu Leu Ser Tyr Ala Thr Val Leu Ser Glu Ala Val Arg Phe  
210 215 220

ES 2 653 287 T3

Arg Ser Ile Gln Gly Asn Phe Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asp Asp Ala  
 225 230 235 240

Phe Thr Pro Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Asp Ser Asn Arg Thr Thr Arg  
 245 250 255

Trp Asp Arg Leu Ser Asp Glu Ile Arg Lys Ala His Tyr Gly Ala Ile  
 260 265 270

Lys Ile Ala Thr His Gly Ala Ala Pro Ile Leu Leu Ala Asn Val Arg  
 275 280 285

Asp Val Phe Gly Met Thr Thr Cys Thr Ser Lys Lys  
 290 295 300

<210> 162

<211> 521

5

<212> PRT

<213> región de no unión a PA de endopeptidasa del factor de Anthrax letal (34-295) 6x  
 Etiqueta de histidina

<400> 162

10



ES 2 653 287 T3

Gln Arg Met Leu Ala Arg Tyr Glu Lys Trp Glu Lys Ile Lys Gln His  
 1 5 10 15

Tyr Gln His Trp Ser Asp Ser Leu Ser Glu Glu Gly Arg Gly Leu Leu  
 20 25 30

Lys Lys Leu Gln Ile Pro Ile Glu Pro Lys Lys Asp Asp Ile Ile His  
 35 40 45

Ser Leu Ser Gln Glu Glu Lys Glu Leu Leu Lys Arg Ile Gln Ile Asp  
 50 55 60

Ser Ser Asp Phe Leu Ser Thr Glu Glu Lys Glu Phe Leu Lys Lys Leu  
 65 70 75 80

Gln Ile Asp Ile Arg Asp Ser Leu Ser Glu Glu Glu Lys Glu Leu Leu  
 85 90 95

Asn Arg Ile Gln Val Asp Ser Ser Asn Pro Leu Ser Glu Lys Glu Lys  
 100 105 110

Glu Phe Leu Lys Lys Leu Lys Leu Asp Ile Gln Pro Tyr Asp Ile Asn  
 115 120 125

Gln Arg Leu Gln Asp Thr Gly Gly Leu Ile Asp Ser Pro Ser Ile Asn  
 130 135 140

Leu Asp Val Arg Lys Gln Tyr Lys Arg Asp Ile Gln Asn Ile Asp Ala

ES 2 653 287 T3

145						150									155					160
Leu	Leu	His	Gln	Ser	Ile	Gly	Ser	Thr	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Tyr	Leu					
				165					170					175						
Tyr	Glu	Asn	Met	Asn	Ile	Asn	Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Asp					
			180					185					190							
Leu	Val	Asp	Ser	Thr	Asp	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	Arg	Gly	Ile	Phe	Asn					
		195					200					205								
Glu	Phe	Lys	Lys	Asn	Phe	Lys	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Tyr	Met	Ile					
	210					215						220								
Val	Asp	Ile	Asn	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp	Asn	Glu	Arg	Leu	Lys	Trp					
225					230					235					240					
Arg	Ile	Gln	Leu	Ser	Pro	Asp	Thr	Arg	Ala	Gly	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly					
				245					250					255						
Lys	Leu	Ile	Leu	Gln	Arg	Asn	Ile	Gly	Leu	Glu	Ile	Lys	Asp	Val	Gln					
			260					265					270							
Ile	Ile	Lys	Gln	Ser	Glu	Lys	Glu	Tyr	Ile	Arg	Ile	Asp	Ala	Lys	Val					
		275					280					285								
Val	Pro	Lys	Ser	Lys	Ile	Asp	Thr	Lys	Ile	Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Asn					
	290					295					300									
Ile	Asn	Gln	Glu	Trp	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Lys	Tyr	Thr	Lys					
305					310					315					320					
Leu	Ile	Thr	Phe	Asn	Val	His	Asn	Arg	Tyr	Ala	Ser	Asn	Ile	Val	Glu					
				325					330					335						
Ser	Ala	Tyr	Leu	Ile	Leu	Asn	Glu	Trp	Lys	Asn	Asn	Ile	Gln	Ser	Asp					
			340					345					350							
Leu	Ile	Lys	Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Gly	Arg	Phe					
		355					360					365								
Val	Phe	Thr	Asp	Ile	Thr	Leu	Pro	Asn	Ile	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	His					
	370					375					380									
Gln	Asp	Glu	Ile	Tyr	Glu	Gln	Val	His	Ser	Lys	Gly	Leu	Tyr	Val	Pro					
385					390					395					400					
Glu	Ser	Arg	Ser	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Pro	Ser	Lys	Gly	Val	Glu	Leu					
				405					410					415						

ES 2 653 287 T3

Arg Asn Asp Ser Glu Gly Phe Ile His Glu Phe Gly His Ala Val Asp  
 420 425 430

Asp Tyr Ala Gly Tyr Leu Leu Asp Lys Asn Gln Ser Asp Leu Val Thr  
 435 440 445

Asn Ser Lys Lys Phe Ile Asp Ile Phe Lys Glu Glu Gly Ser Asn Leu  
 450 455 460

Thr Ser Tyr Gly Arg Thr Asn Glu Ala Glu Phe Phe Ala Glu Ala Phe  
 465 470 475 480

Arg Leu Met His Ser Thr Asp His Ala Glu Arg Leu Lys Val Gln Lys  
 485 490 495

Asn Ala Pro Lys Thr Phe Gln Phe Ile Asn Asp Gln Ile Lys Phe Ile  
 500 505 510

Ile Asn Ser His His His His His His  
 515 520

<210> 163  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 <213> toxina diftérica de *Corynebacterium* 6x etiqueta de histidina  
 <400> 163

5

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu  
 1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile  
 20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp  
 35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala  
 50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly  
 65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys  
 85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Phe Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr  
 100 105 110

10

ES 2 653 287 T3

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

370

375

380

**His His His His His**  
**385**

5

<210> 164

<211> 506

<212> PRT

<213> *Clostridium perfringens* str. 13 pfoA perfringolisina O 6x etiqueta de histidina

<400> 164

ES 2 653 287 T3

Met Ile Arg Phe Lys Lys Thr Lys Leu Ile Ala Ser Ile Ala Met Ala  
 1 5 10 15

Leu Cys Leu Phe Ser Gln Pro Val Ile Ser Phe Ser Lys Asp Ile Thr  
 20 25 30

Asp Lys Asn Gln Ser Ile Asp Ser Gly Ile Ser Ser Leu Ser Tyr Asn  
 35 40 45

Arg Asn Glu Val Leu Ala Ser Asn Gly Asp Lys Ile Glu Ser Phe Val  
 50 55 60

Pro Lys Glu Gly Lys Lys Thr Gly Asn Lys Phe Ile Val Val Glu Arg  
 65 70 75 80

Gln Lys Arg Ser Leu Thr Thr Ser Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp  
 85 90 95

Ser Val Asn Asp Arg Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Gln Leu Ala Asp Lys  
 100 105 110

Ala Phe Val Glu Asn Arg Pro Thr Ile Leu Met Val Lys Arg Lys Pro  
 115 120 125

Ile Asn Ile Asn Ile Asp Leu Pro Gly Leu Lys Gly Glu Asn Ser Ile  
 130 135 140

Lys Val Asp Asp Pro Thr Tyr Gly Lys Val Ser Gly Ala Ile Asp Glu  
 145 150 155 160

Leu Val Ser Lys Trp Asn Glu Lys Tyr Ser Ser Thr His Thr Leu Pro  
 165 170 175

Ala Arg Thr Gln Tyr Ser Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile  
 180 185 190

Ser Ser Ala Leu Asn Val Asn Ala Lys Val Leu Glu Asn Ser Leu Gly  
 195 200 205

ES 2 653 287 T3

Val Asp Phe Asn Ala Val Ala Asn Asn Glu Lys Lys Val Met Ile Leu  
 210 215 220

Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asp Leu Pro Lys Asn  
 225 230 235 240

Pro Ser Asp Leu Phe Asp Asp Ser Val Thr Phe Asn Asp Leu Lys Gln  
 245 250 255

Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro Leu Met Val Ser Asn Val Ala  
 260 265 270

Tyr Gly Arg Thr Ile Tyr Val Lys Leu Glu Thr Thr Ser Ser Ser Lys  
 275 280 285

Asp Val Gln Ala Ala Phe Lys Ala Leu Ile Lys Asn Thr Asp Ile Lys  
 290 295 300

Asn Ser Gln Gln Tyr Lys Asp Ile Tyr Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala  
 305 310 315 320

Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Gln Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys  
 325 330 335

Asp Phe Asp Glu Ile Arg Lys Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser  
 340 345 350

Thr Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys  
 355 360 365

Asp Asn Ser Val Ala Ala Val His Asn Lys Thr Asp Tyr Ile Glu Thr  
 370 375 380

Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Lys Gly Lys Ile Asn Leu Asp His Ser Gly  
 385 390 395 400

Ala Tyr Val Ala Gln Phe Glu Val Ala Trp Asp Glu Val Ser Tyr Asp  
 405 410 415

Lys Glu Gly Asn Glu Val Leu Thr His Lys Thr Trp Asp Gly Asn Tyr  
 420 425 430

Gln Asp Lys Thr Ala His Tyr Ser Thr Val Ile Pro Leu Glu Ala Asn  
 435 440 445

Ala Arg Asn Ile Arg Ile Lys Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp  
 450 455 460

ES 2 653 287 T3

Glu Trp Trp Arg Asp Val Ile Ser Glu Tyr Asp Val Pro Leu Thr Asn  
465 470 475 480

Asn Ile Asn Val Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gly Ser Ser  
485 490 495

Ile Thr Tyr Asn His His His His His His  
500 505

- <210> 165
- <211> 273
- 5 <212> PRT
- <213> cadena Ricina A 6x etiqueta de histidina
- <400> 165



ES 2 653 287 T3

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

Thr Val Gln Ser Tyr Thr Asn Phe Ile Arg Ala Val Arg Gly Arg Leu  
20 25 30

Thr Thr Gly Ala Asp Val Arg His Glu Ile Pro Val Leu Pro Asn Arg  
35 40 45

Val Gly Leu Pro Ile Asn Gln Arg Phe Ile Leu Val Glu Leu Ser Asn  
50 55 60

His Ala Glu Leu Ser Val Thr Leu Ala Leu Asp Val Thr Asn Ala Tyr  
65 70 75 80

Val Val Gly Tyr Arg Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Phe Phe His Pro Asp  
85 90 95

Ala Gln Glu Asp Ala Glu Ala Ile Thr His Leu Phe Thr Asp Val Gln  
100 105 110

Asn Arg Tyr Thr Phe Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Asp Arg Leu Glu Gln  
115 120 125

Leu Ala Gly Asn Leu Arg Glu Asn Ile Glu Leu Gly Asn Gly Pro Leu  
130 135 140

Glu Glu Ala Ile Ser Ala Leu Tyr Tyr Tyr Ser Thr Gly Gly Thr Gln  
145 150 155 160

Leu Pro Thr Leu Ala Arg Ser Phe Ile Ile Cys Ile Gln Met Ile Ser  
165 170 175

Glu Ala Ala Arg Phe Gln Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg Thr Arg Ile  
180 185 190

ES 2 653 287 T3

Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Ala Pro Asp Pro Ser Val Ile Thr Leu Glu  
195 200 205

Asn Ser Trp Gly Arg Leu Ser Thr Ala Ile Gln Glu Ser Asn Gln Gly  
210 215 220

Ala Phe Ala Ser Pro Ile Gln Leu Gln Arg Arg Asn Gly Ser Lys Phe  
225 230 235 240

Ser Val Tyr Asp Val Ser Ile Leu Ile Pro Ile Ile Ala Leu Met Val  
245 250 255

Tyr Arg Cys Ala Pro Pro Pro Ser Ser Gln Phe His His His His His  
260 265 270

His

- <210> 166
- <211> 285
- <212> PRT
- <213> Cadena de Ricina A conector peptídico 6x etiqueta de histidina
- <400> 166

5

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

Thr Val Gln Ser Tyr Thr Asn Phe Ile Arg Ala Val Arg Gly Arg Leu  
20 25 30

Thr Thr Gly Ala Asp Val Arg His Glu Ile Pro Val Leu Pro Asn Arg  
35 40 45

Val Gly Leu Pro Ile Asn Gln Arg Phe Ile Leu Val Glu Leu Ser Asn  
50 55 60

His Ala Glu Leu Ser Val Thr Leu Ala Leu Asp Val Thr Asn Ala Tyr  
65 70 75 80

Val Val Gly Tyr Arg Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Phe Phe His Pro Asp  
85 90 95

Ala Gln Glu Asp Ala Glu Ala Ile Thr His Leu Phe Thr Asp Val Gln  
100 105 110

Asn Arg Tyr Thr Phe Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Asp Arg Leu Glu Gln  
115 120 125

10

ES 2 653 287 T3

Leu Ala Gly Asn Leu Arg Glu Asn Ile Glu Leu Gly Asn Gly Pro Leu  
 130 135 140  
 Glu Glu Ala Ile Ser Ala Leu Tyr Tyr Tyr Ser Thr Gly Gly Thr Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Thr Leu Ala Arg Ser Phe Ile Ile Cys Ile Gln Met Ile Ser  
 165 170 175  
 Glu Ala Ala Arg Phe Gln Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg Thr Arg Ile  
 180 185 190  
 Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Ala Pro Asp Pro Ser Val Ile Thr Leu Glu  
 195 200 205  
 Asn Ser Trp Gly Arg Leu Ser Thr Ala Ile Gln Glu Ser Asn Gln Gly  
 210 215 220  
 Ala Phe Ala Ser Pro Ile Gln Leu Gln Arg Arg Asn Gly Ser Lys Phe  
 225 230 235 240  
 Ser Val Tyr Asp Val Ser Ile Leu Ile Pro Ile Ile Ala Leu Met Val  
 245 250 255  
 Tyr Arg Cys Ala Pro Pro Pro Ser Ser Gln Phe Ser Leu Leu Ile Arg  
 260 265 270  
 Pro Val Val Pro Asn Phe Asn His His His His His His  
 275 280 285

<210> 167

<211> 256

<212> PRT

<213> Bouganina RIP de Planta con potencial inmunogénico reducido 6x etiqueta de histidina

<400> 167

5

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

<210> 168

<211> 149

<212> PRT

5 <213> Proteína ibunucleasa ARNasa3 humana (familia A de ARNasa, 3) sin péptido señal N-terminal pero con una secuencia de localización nuclear N-terminal 6x etiqueta de histidina

<400> 168

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Ala Ser Arg Pro Pro Gln Phe Thr  
1 5 10 15

Arg Ala Gln Trp Phe Ala Ile Gln His Ile Ser Leu Asn Pro Pro Arg  
20 25 30

Cys Thr Ile Ala Met Arg Ala Ile Asn Asn Tyr Arg Trp Arg Cys Lys  
35 40 45

Asn Gln Asn Thr Phe Leu Arg Thr Thr Phe Ala Asn Val Val Asn Val  
50 55 60

Cys Gly Asn Gln Ser Ile Arg Cys Pro His Asn Arg Thr Leu Asn Asn  
65 70 75 80

Cys His Arg Ser Arg Phe Arg Val Pro Leu Leu His Cys Asp Leu Ile  
85 90 95

Asn Pro Gly Ala Gln Asn Ile Ser Asn Cys Thr Tyr Ala Asp Arg Pro  
100 105 110

Gly Arg Arg Phe Tyr Val Val Ala Cys Asp Asn Arg Asp Pro Arg Asp  
115 120 125

Ser Pro Arg Tyr Pro Val Val Pro Val His Leu Asp Thr Thr Ile His  
130 135 140

His His His His His  
145

10

<210> 169

<211> 18

<212> PRT

15 <213> anticuerpo IgE-ND antígeno para línea celular de mieloma humano U266

<400> 169

Leu Ser Pro His Leu Leu Trp Asp Leu Phe Arg Val Gly Leu Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Ala

20

<210> 170

<211> 146

<212> PRT

<213> *Dermatophagoides farinae*

<400> 170

Met Ile Ser Lys Ile Leu Cys Leu Ser Leu Leu Val Ala Ala Val Val  
1 5 10 15

Ala Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn Asn Glu Ile Lys Lys  
20 25 30

Val Met Val Asp Gly Cys His Gly Ser Asp Pro Cys Ile Ile His Arg  
35 40 45

5

Gly Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp Ala Asn Gln Asn Thr  
50 55 60

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

Asp Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Met Lys Cys Pro  
85 90 95

Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro  
100 105 110

Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Leu Ile  
115 120 125

Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Gly Lys Ile  
130 135 140

Arg Asp  
145

10

<210> 171  
<211> 320  
<212> PRT  
<213> *Dermatophagoides pteronyssinus*

15

<400> 171

ES 2 653 287 T3

Met Lys Ile Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val  
 1 5 10 15

Tyr Ala Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala  
 20 25 30

Phe Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys  
 35 40 45

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile  
 50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn  
 85 90 95

Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile  
 100 105 110

Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly  
 115 120 125

ES 2 653 287 T3

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

<210> 172

<211> 141

<212> PRT

<213> *Tyrophagus putrescentiae*

<400> 172

5



ES 2 653 287 T3

Met Lys Phe Leu Ile Leu Phe Ala Leu Val Ala Val Ala Ala Ala Gly  
 1 5 10 15

Gln Val Lys Phe Thr Asp Cys Gly Lys Lys Glu Ile Ala Ser Val Ala  
 20 25 30

Val Asp Gly Cys Glu Gly Asp Leu Cys Val Ile His Lys Ser Lys Pro  
 35 40 45

Val His Val Ile Ala Glu Phe Thr Ala Asn Gln Asp Thr Cys Lys Ile  
 50 55 60

Glu Val Lys Val Thr Gly Gln Leu Asn Gly Leu Glu Val Pro Ile Pro  
 65 70 75 80

Gly Ile Glu Thr Asp Gly Cys Lys Val Leu Lys Cys Pro Leu Lys Lys  
 85 90 95

Gly Thr Lys Tyr Thr Met Asn Tyr Ser Val Asn Val Pro Ser Val Val  
 100 105 110

Pro Asn Ile Lys Thr Val Val Lys Leu Leu Ala Thr Gly Glu His Gly  
 115 120 125

Val Leu Ala Cys Gly Ala Val Asn Thr Asp Val Lys Pro  
 130 135 140

5 <210> 173  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> *Felis catus*

10 <400> 173

ES 2 653 287 T3

Met Arg Gly Ala Leu Leu Val Leu Ala Leu Leu Val Thr Gln Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe  
20 25 30

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys  
35 40 45

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

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val  
65 70 75 80

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln  
85 90 95

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg  
100 105

<210> 174  
<211> 92  
<212> PRT  
<213> *Felis catus*

5

<400> 174

Met Lys Gly Ala Cys Val Leu Val Leu Leu Trp Ala Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Ile Ser Gly Gly Asn Cys Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val  
20 25 30

Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala  
35 40 45

Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys  
50 55 60

Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu  
65 70 75 80

Ser Val Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys  
85 90

10

<210> 175  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> *Felis catus*

15

ES 2 653 287 T3

<400> 175

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly  
 1 5 10 15

Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro  
 20 25 30

Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys  
 35 40 45

Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile  
 50 55 60

Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe  
 65 70 75 80

Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp  
 85 90 95

Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met  
 100 105 110

Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val  
 115 120 125

Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met  
 130 135 140

Gly Glu  
 145

5

- <210> 176
- <211> 172
- <212> PRT
- <213> *Arachis hypogaea*

10

<400> 176

ES 2 653 287 T3

Met Ala Lys Leu Thr Ile Leu Val Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala His Ala Ser Ala Arg Gln Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg  
 20 25 30

Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His  
 35 40 45

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

Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Asp Arg  
 65 70 75 80

Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly Ser  
 85 90 95

Ser Gln His Gln Glu Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn  
 100 105 110

Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met Glu Asn Gln  
 115 120 125

Ser Asp Arg Leu Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg Glu  
 130 135 140

Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg Cys  
 145 150 155 160

Asp Leu Glu Val Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr  
 165 170

<210> 177  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> *Alternaria alternata* (hongo de la putrefacción Alternaria)  
 <400> 177

5

ES 2 653 287 T3

Met Gln Phe Thr Thr Ile Ala Ser Leu Phe Ala Ala Ala Gly Leu Ala  
 1 5 10 15

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

Thr Thr Glu Gly Asp Tyr Val Trp Lys Ile Ser Glu Phe Tyr Gly Arg  
 35 40 45

Lys Pro Glu Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu Gly Phe Asn Ile Lys Ala  
 50 55 60

Thr Asn Gly Gly Thr Leu Asp Phe Thr Cys Ser Ala Gln Ala Asp Lys  
 65 70 75 80

Leu Glu Asp His Lys Trp Tyr Ser Cys Gly Glu Asn Ser Phe Met Asp  
 85 90 95

Phe Ser Phe Asp Ser Asp Arg Ser Gly Leu Leu Leu Lys Gln Lys Val  
 100 105 110

Ser Asp Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Cys  
 115 120 125

Arg Ala Gly Gly Asn Gly Pro Lys Asp Phe Val Cys Gln Gly Val Ala  
 130 135 140

Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr Leu Pro Lys Ser Ser  
 145 150 155

<210> 178  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 178

Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ile Gly Phe Ser Leu Ile Ala Ile Leu  
 1 5 10 15

Gln Ala Gln Asp Thr Pro Ala Leu Gly Lys Asp Thr Val Ala Val Ser  
 20 25 30

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

Lys Pro Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys Gly Gly  
 50 55 60

10

ES 2 653 287 T3

Asn Leu Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn  
 65 70 75 80

Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala  
 85 90 95

Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp  
 100 105 110

His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Arg Gln Ile Arg  
 115 120 125

Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu  
 130 135 140

Glu Asp Phe Arg Glu Phe Ser Arg Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile  
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln  
 165 170

- <210> 179
- <211> 286
- <212> PRT
- <213> Triticum aestivum

5

<400> 179



ES 2 653 287 T3

	115		120		125														
Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln	Gln	Leu	Ile				
	130					135					140								
Pro	Cys	Met	Asp	Val	Val	Leu	Gln	Gln	His	Asn	Ile	Ala	His	Gly	Arg				
145					150					155					160				
Ser	Gln	Val	Leu	Gln	Gln	Ser	Thr	Tyr	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Cys				
				165					170					175					
Cys	Gln	His	Leu	Trp	Gln	Ile	Pro	Glu	Gln	Ser	Gln	Cys	Gln	Ala	Ile				
			180					185					190						
His	Asn	Val	Val	His	Ala	Ile	Ile	Leu	His	Gln	Gln	Gln	Lys	Gln	Gln				
		195					200						205						
Gln	Gln	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Ser	Phe	Gln	Gln	Pro	Leu	Gln	Gln	Tyr				
		210				215					220								
Pro	Leu	Gly	Gln	Gly	Ser	Phe	Arg	Pro	Ser	Gln	Gln	Asn	Pro	Gln	Ala				
225					230					235					240				
Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Phe	Glu	Glu	Ile	Arg				
				245					250					255					
Asn	Leu	Ala	Leu	Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Met	Cys	Asn	Val	Tyr	Ile	Pro				
			260					265					270						
Pro	Tyr	Cys	Thr	Ile	Ala	Pro	Phe	Gly	Ile	Phe	Gly	Thr	Asn						
		275					280					285							

<210> 180  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> *Blattella germanica*  
 <400> 180

5



ES 2 653 287 T3

Ala Ile Glu Phe Leu Asn Asn Ile His Asp Leu Leu Gly Ile Pro His  
1 5 10 15

Ile Pro Val Thr Ala Arg Lys His His Arg Arg Gly Val Gly Ile Thr  
20 25 30

Gly Leu Ile Asp Asp Ile Ile Ala Ile Leu Pro Val Asp Asp Leu Tyr  
35 40 45

Ala Leu Phe Gln Glu Lys Leu Glu Thr Ser Pro Glu Phe Lys Ala Leu  
50 55 60

ES 2 653 287 T3

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

ES 2 653 287 T3

Ile Asp Gln Ile Leu Ala Ile Ala Ala Asp Tyr Leu Ala Asn Asp Ala  
 325 330 335

Glu Val Gln Ala Ala Val Glu Tyr Leu Lys Ser Asp Glu Phe Glu Thr  
 340 345 350

Ile Val Val Thr Val Asp Ser Leu Pro Glu Phe Lys Asn Phe Leu Asn  
 355 360 365

Phe Leu Gln Thr Asn Gly Leu Asn Ala Ile Glu Phe Ile Asn Asn Ile  
 370 375 380

His Asp Leu Leu Gly Ile Pro His Ile Pro Ala Thr Gly Arg Lys His  
 385 390 395 400

Val Arg Arg Gly Val Gly Ile Asn Gly Leu Ile Asp Asp Val Ile Ala  
 405 410 415

Ile Leu Pro Val Asp Glu Leu Tyr Ala Leu Phe Gln Glu Lys Leu Glu  
 420 425 430

Ser Ser Pro Glu Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Ala Ile Arg Ser Pro Glu  
 435 440 445

Phe Gln Ser Ile Val Gln Thr Leu Lys Ala Met Pro Glu Tyr Gln Asp  
 450 455 460

Leu Ile Gln Arg Leu Lys Asp Lys Gly Val Asp Val Asp His Phe Ile  
 465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Lys Leu Phe Gly Leu Ser His  
 485 490

5

<210> 181  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> *Betula pendula (Betula verrucosa)*  
 <400> 181



ES 2 653 287 T3

Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Ala Thr Ser Val Ile Pro Ala  
 1 5 10 15

Ala Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Lys Leu Val Pro  
 20 25 30

Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn  
 35 40 45

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Asn Phe Pro Glu Gly Phe Pro  
 50 55 60

Phe Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe  
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Val Gly Asp Thr Leu  
 85 90 95

Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly  
 100 105 110

Cys Val Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asn His Glu  
 115 120 125

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

Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn  
 145 150 155 160

5 <210> 183  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> *Betula pendula* (*Betula verrucosa*)

10 <400> 183

ES 2 653 287 T3

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
 20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu  
 35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
 50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
 65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
 85 90 95

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

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
 130

<210> 184  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> *Phleum pratense*  
 <400> 184

5

Met Ala Ser Ser Ser Ser Val Leu Leu Val Val Val Leu Phe Ala Val  
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Ser Ala Tyr Gly Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn  
 20 25 30

10

ES 2 653 287 T3

Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp  
35 40 45

Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys  
50 55 60

Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys  
65 70 75 80

Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe  
85 90 95

Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val  
100 105 110

Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe  
115 120 125

Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu  
130 135 140

Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val  
145 150 155 160

Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys  
165 170 175

Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly  
180 185 190

Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys  
195 200 205

Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr  
210 215 220

Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala  
245 250 255

Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys  
260

<210> 185  
<211> 122  
<212> PRT

ES 2 653 287 T3

<213> *Phleum pratense*

<400> 185

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

5

<210> 186

<211> 159

<212> PRT

10 <213> *Malus domestica*

<400> 186



ES 2 653 287 T3

Met Gly Val Tyr Thr Phe Glu Asn Glu Phe Thr Ser Glu Ile Pro Pro  
 1 5 10 15

Ser Arg Leu Phe Lys Ala Phe Val Leu Asp Ala Asp Asn Leu Ile Pro  
 20 25 30

Lys Ile Ala Pro Gln Ala Ile Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Gly Asn  
 35 40 45

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Thr Phe Gly Glu Gly Ser Gln  
 50 55 60

Tyr Gly Tyr Val Lys His Arg Ile Asp Ser Ile Asp Glu Ala Ser Tyr  
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Tyr Thr Leu Ile Glu Gly Asp Ala Leu Thr Asp Thr Ile  
 85 90 95

Glu Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Lys Leu Val Ala Cys Gly Ser Gly Ser  
 100 105 110

Thr Ile Lys Ser Ile Ser His Tyr His Thr Lys Gly Asn Ile Glu Ile  
 115 120 125

Lys Glu Glu His Val Lys Val Gly Lys Glu Lys Ala His Gly Leu Phe  
 130 135 140

Lys Leu Ile Glu Ser Tyr Leu Lys Asp His Pro Asp Ala Tyr Asn  
 145 150 155

5 <210> 187  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Dactylis glomerata*

10 <400> 187

ES 2 653 287 T3

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

Val Leu Asp Ile Lys Tyr Thr Arg Pro Gly Asp Thr Leu Ala Glu Val  
 20 25 30

Glu Leu Arg Gln His Gly Ser Glu Glu Trp Glu Pro Leu Thr Lys Lys  
 35 40 45

Gly Asn Leu Trp Glu Val Lys Ser Ser Lys Pro Leu Thr Gly Pro Phe  
 50 55 60

Asn Phe Arg Phe Met Ser Lys Gly Gly Met Arg Asn Val Phe Asp Glu  
 65 70 75 80

Val Ile Pro Thr Ala Phe Lys Ile Gly Thr Thr Tyr Thr Pro Glu Glu  
 85 90 95

<210> 188

<211> 269

<212> PRT

<213> *Phalaris aquatica*

<400> 188

Met Met Lys Met Val Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Leu Val Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Ala Val Phe Val Gly Ser Ala Gln Gly Ile Ala Lys  
 20 25 30

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

5

10

ES 2 653 287 T3

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

<210> 189  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> *Cynodon dactylon*

5

<400> 189

ES 2 653 287 T3

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

Lys Trp Leu Glu Ala Arg Ala Thr Phe Tyr Gly Ser Asn Pro Arg Gly  
20 25 30

Ala Ala Pro Asp Asp His Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp  
35 40 45

Lys Pro Pro Phe Asp Gly Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu Pro Ile Phe  
50 55 60

Lys Asp Gly Leu Gly Cys Arg Ala Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys Glu  
65 70 75 80

Pro Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro Val Leu Val Lys Ile Thr Asp Lys  
85 90 95

Asn Tyr Glu His Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Lys Ala  
100 105 110

Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Gln Glu Asp Lys Leu Arg Lys Ala  
115 120 125

Gly Glu Leu Thr Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Ser  
130 135 140

Gly Thr Lys Ile Thr Phe His Ile Glu Lys Gly Ser Asn Asp His Tyr  
145 150 155 160

Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Asp Gly Asn Ile Val Ala  
165 170 175

Val Asp Ile Lys Pro Arg Asp Ser Asp Glu Phe Ile Pro Met Lys Ser  
180 185 190

Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu Lys Gly  
195 200 205

Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Glu Gly Gly Ala His Leu Val Gln  
210 215 220

Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser  
225 230 235 240

Lys Leu Gln Phe Gly Ala  
245

ES 2 653 287 T3

<210> 190  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Bos primigenius*

5

<400> 190

```

Met Lys Leu Leu Ile Leu Thr Cys Leu Val Ala Val Ala Leu Ala Arg
 1           5           10           15

Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn
 20           25           30

Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly
 35           40           45

Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu Ser Thr
 50           55           60

Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile
 65           70           75           80

Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His Ile
 85           90           95

Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln
 100          105          110

Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro
 115          120

Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His Ala
 130          135          140

Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe
 145          150          155          160

Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro Ser
 165          170          175

Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala Pro
 180          185          190

Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu Lys
 195          200          205

Thr Thr Met Pro Leu Trp
 210
    
```

ES 2 653 287 T3

<210> 191  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> *Bos primigenius*

5

<400> 191

```

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe His Ala
 1          5          10          15

Thr Gln Ala Glu Gln Leu Thr Lys Cys Glu Val Phe Arg Glu Leu Lys
          20          25          30

Asp Leu Lys Gly Tyr Gly Gly Val Ser Leu Pro Glu Trp Val Cys Thr
          35          40          45

Thr Phe His Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala Ile Val Gln Asn Asn
 50          55          60

Asp Ser Thr Glu Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Asn Asn Lys Ile Trp Cys
 65          70          75          80

Lys Asp Asp Gln Asn Pro His Ser Ser Asn Ile Cys Asn Ile Ser Cys
          85          90          95

Asp Lys Phe Leu Asp Asp Asp Leu Thr Asp Asp Ile Met Cys Val Lys
          100          105          110

Lys Ile Leu Asp Lys Val Gly Ile Asn Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala
          115          120          125

Leu Cys Ser Glu Lys Leu Asp Gln Trp Leu Cys Glu Lys Leu
          130          135          140
    
```

10 <210> 192  
 <211> 386  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

15 <400> 192

ES 2 653 287 T3

Met Gly Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe  
1 5 10 15

Lys Glu Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro  
20 25 30

Ile Ala Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp  
35 40 45

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

Gly Phe Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val  
65 70 75 80

ES 2 653 287 T3

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



ES 2 653 287 T3

Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala  
 340 345 350

Ala Ser Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys  
 355 360 365

Ile Lys His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val  
 370 375 380

Ser Pro  
 385

5 <210> 193  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 193

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg  
 20 25 30

His Gly Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys  
 35 40 45

Ala Ala Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg Asn  
 50 55 60

Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg Trp  
 65 70 75 80

Trp Cys Asn Asp Gly Arg Thr Pro Gly Ser Arg Asn Leu Cys Asn Ile  
 85 90 95

Pro Cys Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Thr Ala Ser Val Asn Cys  
 100 105 110

Ala Lys Lys Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met Asn Ala Trp Val Ala  
 115 120 125

Trp Arg Asn Arg Cys Lys Gly Thr Asp Val Gln Ala Trp Ile Arg Gly  
 130 135 140

Cys Arg Leu  
 145

10

ES 2 653 287 T3

<210> 194  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

5

<400> 194

```

Met Lys Leu Leu Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ile Leu Val Cys Ala Gln
 1           5           10           15

Gln Glu Glu Asn Ser Asp Val Ala Ile Arg Asn Phe Asp Ile Ser Lys
      20           25           30

Ile Ser Gly Glu Trp Tyr Ser Ile Phe Leu Ala Ser Asp Val Lys Glu
      35           40           45

Lys Ile Glu Glu Asn Gly Ser Met Arg Val Phe Val Asp Val Ile Arg
 50           55           60

Ala Leu Asp Asn Ser Ser Leu Tyr Ala Glu Tyr Gln Thr Lys Val Asn
65           70           75           80

Gly Glu Cys Thr Glu Phe Pro Met Val Phe Asp Lys Thr Glu Glu Asp
      85           90           95

Gly Val Tyr Ser Leu Asn Tyr Asp Gly Tyr Asn Val Phe Arg Ile Ser
      100          105          110

Glu Phe Glu Asn Asp Glu His Ile Ile Leu Tyr Leu Val Asn Phe Asp
      115          120          125

Lys Asp Arg Pro Phe Gln Leu Phe Glu Phe Tyr Ala Arg Glu Pro Asp
      130          135          140

Val Ser Pro Glu Ile Lys Glu Glu Phe Val Lys Ile Val Gln Lys Arg
145          150          155          160

Gly Ile Val Lys Glu Asn Ile Ile Asp Leu Thr Lys Ile Asp Arg Cys
      165          170          175

Phe Gln Leu Arg Gly Asn Gly Val Ala Gln Ala
      180          185
    
```

10 <210> 195  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*

15 <400> 195

ES 2 653 287 T3

Met Leu Lys Val Ser Cys Leu Phe Val Leu Leu Cys Gly Leu Leu Val  
1 5 10 15

Pro Ser Ser Ala Gln Gln Ile Pro Pro Glu Val Ser Ser Gln Ile Thr  
20 25 30

Asp Ala Leu Thr Gln Gly Leu Leu Asp Gly Asn Phe Leu Ser Leu Leu  
35 40 45

Asn Ala Ile Asn Leu Glu Gly Leu Leu Asn Thr Ile Leu Asp Gln Val  
50 55 60

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

Ala Glu Ile Lys Leu Gln Asp Thr Arg Leu Leu Gln Leu Ser Leu Glu  
85 90 95

Phe Ser Pro Asp Ser Lys Gly Ile Asp Ile Trp Ile Pro Leu Glu Leu  
100 105 110

Ser Val Tyr Leu Lys Leu Leu Ile Leu Glu Pro Leu Thr Leu Tyr Val  
115 120 125

Arg Thr Asp Ile Arg Val Gln Leu Arg Leu Glu Ser Asp Glu Asp Gly  
130 135 140

Lys Tyr Arg Leu Ala Phe Gly His Cys Ser Leu Leu Pro Arg Ala Ile  
145 150 155 160

Glu Leu Gln Ser Gly Asn Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ala Val Leu  
165 170 175

Gly Thr Ile Glu Asn Ala Leu Gly Asn Phe Ile Thr Glu Asp Leu Gly  
180 185 190

Ala Gly Leu Cys Pro Thr Leu Asn Ser Leu Val Ser Asn Leu Asp Leu  
195 200 205

Gln Leu Val Asn Asn Leu Ile Asn Leu Ile Leu Asp Arg Ala Asn Val  
210 215 220

Asp Leu Ser Val  
225

5 <210> 196  
<211> 558  
<212> ADN

ES 2 653 287 T3

<213> Secuencia de nucleótidos que codifica pelB-CD3(VL) - FLAG-BirA-U266Ant-6His

<400> 196

5 atgaaatacc tgetgcegac cgetgctgot ggtotgctgc tctctgctgc ccagccggcg 60  
 atggccgaca ttcagctgac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120  
 gtcacatga cctgcagagc cagttcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag 180  
 tcaggcaoct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aagtggcttc tggagtccct 240  
 tatcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcatactctc tcacaatcag cagcatggag 300  
 gctgaagatg ctgccactta ttactgcca cagtggagta gtaaccocgt cacgttcggt 360  
 gctgggacca agctggagct gaaatccgga ggtggtggat ccgactacaa ggatgacgat 420  
 gacaaaggcg gcggcctgaa cgatattttt gaagcgcaga aaattgaatg gcatctgagc 480  
 ccgcatctgc tgtgggatct gtttcgctg ggcctgccgg gcgcggcggg cggcggccat 540  
 catcaaccatc atcattag 558

<210> 197

<211> 185

<212> PRT

<213> pelB-CD3(VL) - FLAG-BirA-U266Ant-6His

<400> 197

10

ES 2 653 287 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Gly  
 130 135 140

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Leu Ser  
 145 150 155 160

Pro His Leu Leu Trp Asp Leu Phe Arg Val Gly Leu Pro Gly Ala Ala  
 165 170 175

Gly Gly Gly His His His His His His  
 180 185

5 <210> 198  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> conector alternativo

10 <400> 198

Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ala Asp

## REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de polipéptidos que comprende:

- 5 un primer polipéptido P1 que comprende  
 (i) un resto diana T1,  
 en el que dicho resto diana T1 se une específicamente a un antígeno A1, y  
 (ii) un fragmento F1 de un dominio funcional F,  
 10 en el que ni dicho fragmento F1 por sí mismo ni dicho polipéptido P1 por sí mismo es funcional con respecto a la  
 función de dicho dominio F,  
 y  
 un segundo polipéptido P2 que comprende  
 (i) un resto diana T2,  
 en el que dicho resto diana T2 se une específicamente a un antígeno A2, y  
 15 (ii) un fragmento F2 de dicho dominio funcional F,  
 en el que ni dicho fragmento F2 por sí mismo ni dicho polipéptido P2 por sí mismo es funcional con respecto a la  
 función de dicho dominio F,  
 en el que dicho antígeno A1 es diferente de dicho antígeno A2,  
 20 en el que dicho polipéptido P1 y dicho polipéptido P2 no se asocian entre sí en la ausencia de una célula que  
 tiene ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular,  
 en el que, al dimerizarse dicho fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con dicho fragmento F2 de dicho  
 polipéptido P2, el dímero resultante es funcional con respecto a la función de dicho dominio F y  
 en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_L$  de un anticuerpo y dicho fragmento F2 comprende un  
 25 dominio  $V_H$  del mismo anticuerpo; o en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo y  
 dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo.

2. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una célula que lleva ambos antígenos,  
 A1 y A2 en su superficie celular induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2  
 30 de dicho polipéptido P2, mientras que una célula que no lleva ambos antígenos, A1 y A2, en su superficie celular no  
 induce la dimerización del fragmento F1 de dicho polipéptido P1 con el fragmento F2 de dicho polipéptido P2.

3. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichos polipéptidos P1 y P2 tienen,  
 en la ausencia de dicho sustrato o célula, entre sí una constante de disociación  $K_D$  en el intervalo de  $10^8$  M a  $10^2$  M,  
 35 en el intervalo de  $10^7$  M a  $10^3$  M o en el intervalo de  $10^6$  M a  $10^3$  M; y/o dichos polipéptidos P1 y P2 tienen, en la  
 presencia de dicho sustrato o célula, entre sí una constante de disociación  $K_D$  debajo de  $10^6$  M, debajo de  $10^7$  M  
 debajo de  $10^8$  M o debajo de  $10^9$  M.

4. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho antígeno  
 A1 y/o dicho antígeno A2 es un antígeno expresado en la superficie de células de un tumor o en la superficie de  
 40 células progenitoras/precursoras de un tumor.

5. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la combinación  
 de antígeno A1 y antígeno A2 solamente se encuentra en células cancerosas, y no en células que no son  
 45 cancerosas.

6. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la combinación de antígeno A1 y  
 antígeno A2 es específica para células cancerosas de un cierto tipo de cáncer.

7. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho antígeno  
 50 A1 es un antígeno MHC siendo una variante alélica seleccionada del grupo que consiste en:  
 HLA-A2, HLA-Cw6, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4 y HLA-  
 Cw7; y/o  
 dicho antígeno A2 es un antígeno que es específico para un cierto tipo celular o linaje celular seleccionado del grupo  
 que consiste en:  
 55 CD45; CD34; CD33; CD138; CD15; CD1a; CD2; CD3; CD4; CD5; CD8; CD20; CD23; CD31; CD43; CD56; CD57;  
 CD68; CD79a; CD146; proteínas de agente tensioactivo; sinaptofisina; CD56; CD57; receptor de acetilcolina  
 nicotínico; quinasa específica muscular MUSK; canal de calcio dependiente de voltaje (tipo P/Q); canal de potasio  
 dependiente de voltaje (VGKC); receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA); TSH; anfibisina; HepPar-1; gangliósido  
 60 GQ1B, GD3 o GM1; y glicoforina-A.

8. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cualquiera de  
 dichos antígenos A1 y A2 se selecciona del grupo que consiste en:  
 HLA-A2; HLA-Cw6; EpCAM; CD20; CD33; CD38; CD45; Her2; EGFR; CD138; CEA; CD19; PSMA; E-cadherina; Ca-  
 125; Her-2/neu; proteína de fluido de enfermedad quística densa; BCA-225; CA 19-9; CD117; CD30; antígeno  
 65 Epitelial BER-EP4, antígeno de membrana Epitelial y Antígeno Relacionado al Epitelio MOC-31; receptor del factor  
 de crecimiento Epidérmico HER1; receptor del factor de crecimiento derivado de Plaqueta PDGFR alfa; marcador

asociado con Melanoma/Mart 1/Melan-A; CD133; TAG 72; acuaporina-2 y un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B.

9. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que

- 5
- (i) uno de dichos antígenos A1 y A2 es EpCAM y el otro es EGFR, HER2/neu, CD10, VEGF-R o MDR;
  - (ii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es MCSP y el otro es melanoferrina o EpCAM;
  - (iii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CA125 y el otro CD227
  - (iv) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD56 y el otro es CD140b o gangliósido GD3;
  - 10 (v) uno de dichos antígenos A1 y A2 es EGFR y el otro es HER2;
  - (vi) uno de dichos antígenos A1 y A2 es PSMA y el otro es HER2;
  - (vii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es Sialyl Lewis y el otro es EGFR;
  - (viii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD44 y el otro es ESA, CD24, CD133, MDR o CD117;
  - (ix) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD34 y el otro es CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117, CD33 o CD15;
  - 15 (x) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD33 y el otro es CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117 o CD15;
  - (xi) uno de dichos antígenos A1 y A2 es MUC1 y el otro es CD10, CEA o CD57;
  - (xii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD38 y el otro es CD138;
  - 20 (xiii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD24 y el otro es CD29 o CD49f;
  - (xiv) uno de dichos antígenos A1 y A2 es anhidrasa carbónica IX y el otro es acuaporina-2;
  - (xv) uno de dichos antígenos A1 y A2 es HLA-A2 y el otro es EpCAM;
  - (xvi) uno de dichos antígenos A1 y A2 es HLA-A2 y el otro es CD45;
  - (xvii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es HLA-A2 y el otro es EGFR;
  - 25 (xviii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es HLA-A2 y el otro es Her2;
  - (xix) uno de dichos antígenos A1 y A2 es HLA-A2 y el otro es CEA;
  - (xx) uno de dichos antígenos A1 y A2 es EpCAM y el otro es CEA;
  - (xxi) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD45 o CD38 y el otro es CD138;
  - (xxii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es EGFR y el otro es CEA;
  - 30 (xxiii) uno de dichos antígenos A1 y A2 es Her2 y el otro es CEA; o
  - (xxiv) uno de dichos antígenos A1 y A2 es CD19 y el otro es un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B.

35 10. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho resto diana T1 y/o T2 comprende un módulo de inmunoglobulina; o en el que dicho resto diana T1 y/o T2 comprende un aptámero o un ligando natural de dicho antígeno A1 o antígeno A2, respectivamente.

40 11. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho resto diana T1 comprende un módulo de inmunoglobulina I1 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$  o que comprende un dominio variable  $V_{H/H}$  de un anticuerpo de llama, anticuerpo de camello o anticuerpo de tiburón; y/o dicho resto diana T2 comprende un módulo de inmunoglobulina I2 que comprende un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$  o que comprende un dominio variable  $V_{H/H}$  de un anticuerpo de llama, anticuerpo de camello o anticuerpo de tiburón.

45 12. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho módulo de inmunoglobulina I1 comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla), un Fab o un  $F(ab')_2$  de un anticuerpo o un anticuerpo completo; y/o dicho módulo de inmunoglobulina I2 comprende un scFv (fragmento variante de cadena sencilla), un Fab o un  $F(ab')_2$  de un anticuerpo o un anticuerpo completo.

55 13. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 12, en el que uno cualquiera de dicho resto diana T1 y T2 comprende un alérgeno o sustrato que se une a un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B.

14. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho dominio funcional F es o comprende un módulo de inmunoglobulina.

60 15. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho dominio funcional F es un Fv (fragmento variante) o un scFv (fragmento variante de cadena sencilla) de un anticuerpo.

65 16. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_L$  de un anticuerpo anti-CD3, anti-His o anti-DIG y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_H$  del mismo anticuerpo, o en el que dicho fragmento F1 comprende un dominio  $V_H$  de un anticuerpo anti-CD3, anti-His o anti-DIG y dicho fragmento F2 comprende un dominio  $V_L$  del mismo anticuerpo.

17. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicho módulo de inmunoglobulina comprende un dominio V seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (i) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 2 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 1;
- (ii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 4 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 3;
- (iii) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 6 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 5;
- 10 (iv) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 8 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 7;
- (v) un dominio V de un anticuerpo anti-CD3 que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 10 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 9; y
- 15 (vi) un dominio V de un anticuerpo anti-His que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 12 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 11;
- (vii) un dominio V de un anticuerpo anti-DIG que comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende la SEQ ID NO: 14 y/o un dominio V<sub>H</sub> que comprende la SEQ ID NO: 30.

20 18. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que cualquiera de los polipéptidos P1 y P2 es o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 114-129 y 197.

25 19. El conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en el tratamiento de un paciente que está padeciendo cáncer y/o un tumor o para su uso en diagnóstico en un paciente que está padeciendo cáncer y/o un tumor.

30 20. Una molécula de ácido nucleico o un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifica el conjunto de polipéptidos o uno de los polipéptidos del conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

21. La molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 que comprende una secuencia de nucleótidos como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO: 135-150 y 196.

35 22. Una composición farmacéutica que comprende ya sea el conjunto de polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la molécula de ácido nucleico/conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 23. Un kit que comprende el conjunto de polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 o la molécula de ácido nucleico o el conjunto de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 o 21.



Figura 1A

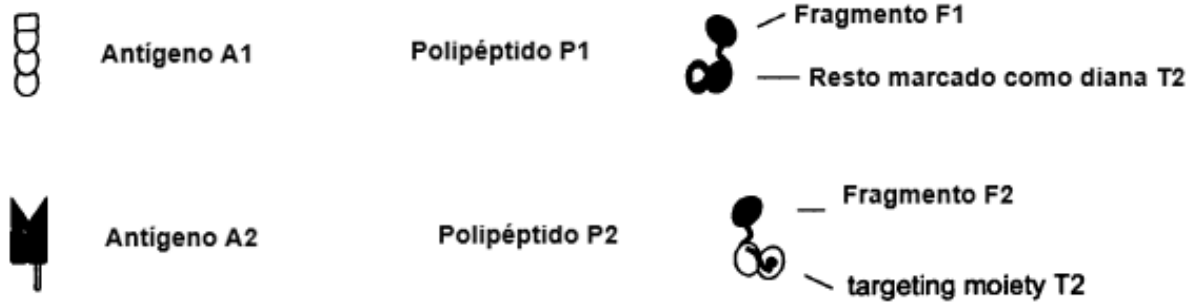


Figura 1B

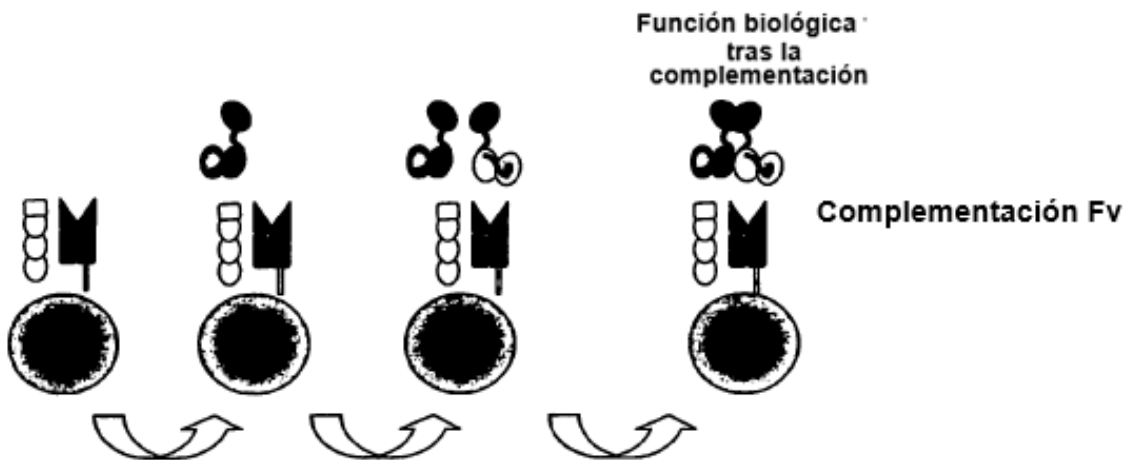


Figura 1C

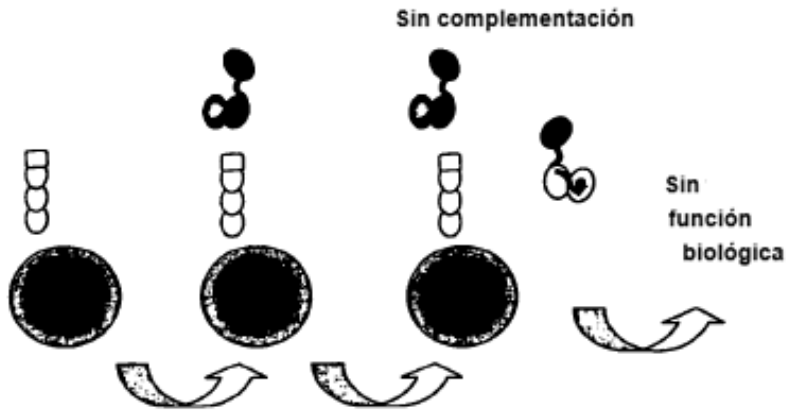


Figura 1D

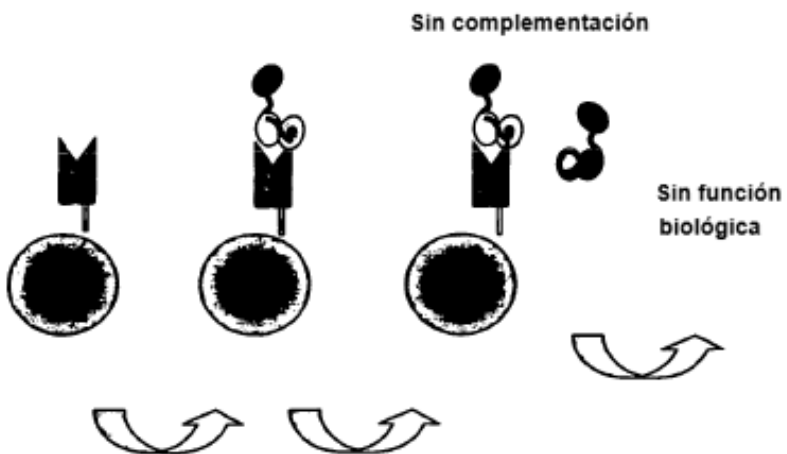


Figura 2

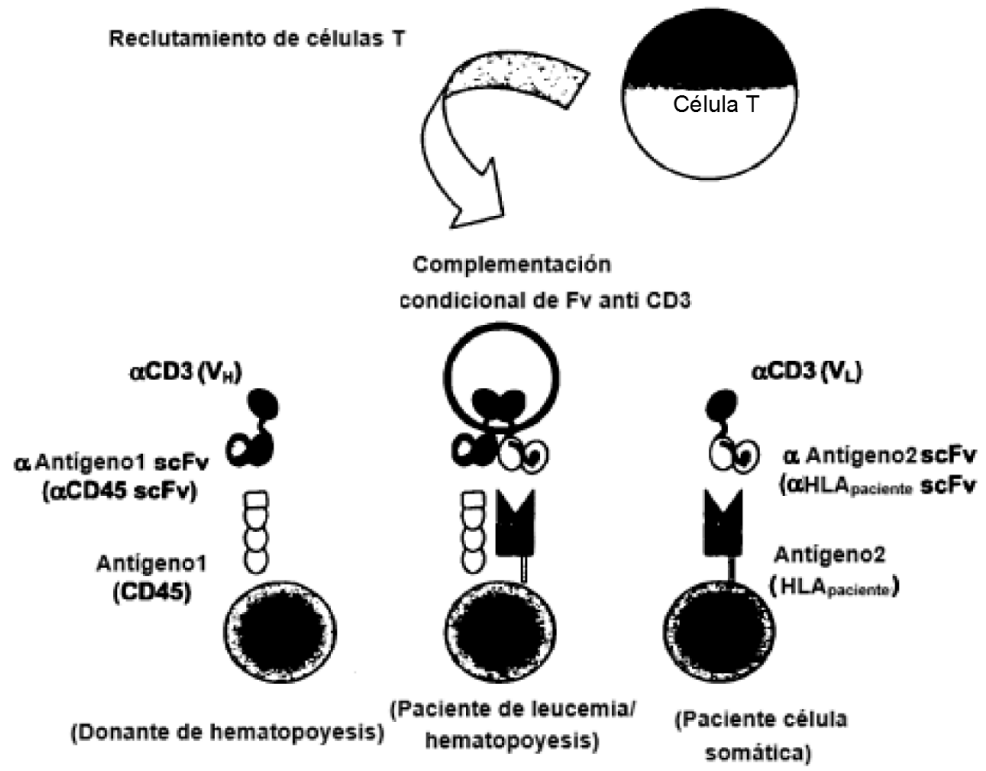
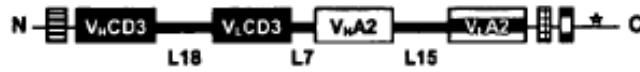
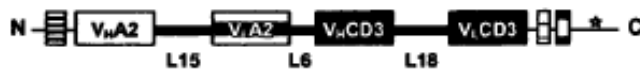


Figura 3A

85/71 taFvCD3-HLA-A2-

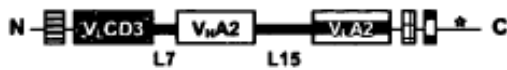


75/82 taFvHLA-A2-CD3-



pelB Lider   
 Conector as   
 Etiqueta His   
 Etiqueta FLAG (o myc)

42 V<sub>L</sub>CD3-scFvHLA-A2-



45 V<sub>H</sub>CD3-scFvCD45(V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>)-



55 V<sub>H</sub>CD3-scFvCD45(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)-



80/78 V<sub>H</sub>CD3-scFvHLA-A2-



pelB Lider   
 Conector as   
 Etiqueta His   
 Etiqueta FLAG (o myc)

Figura 3B

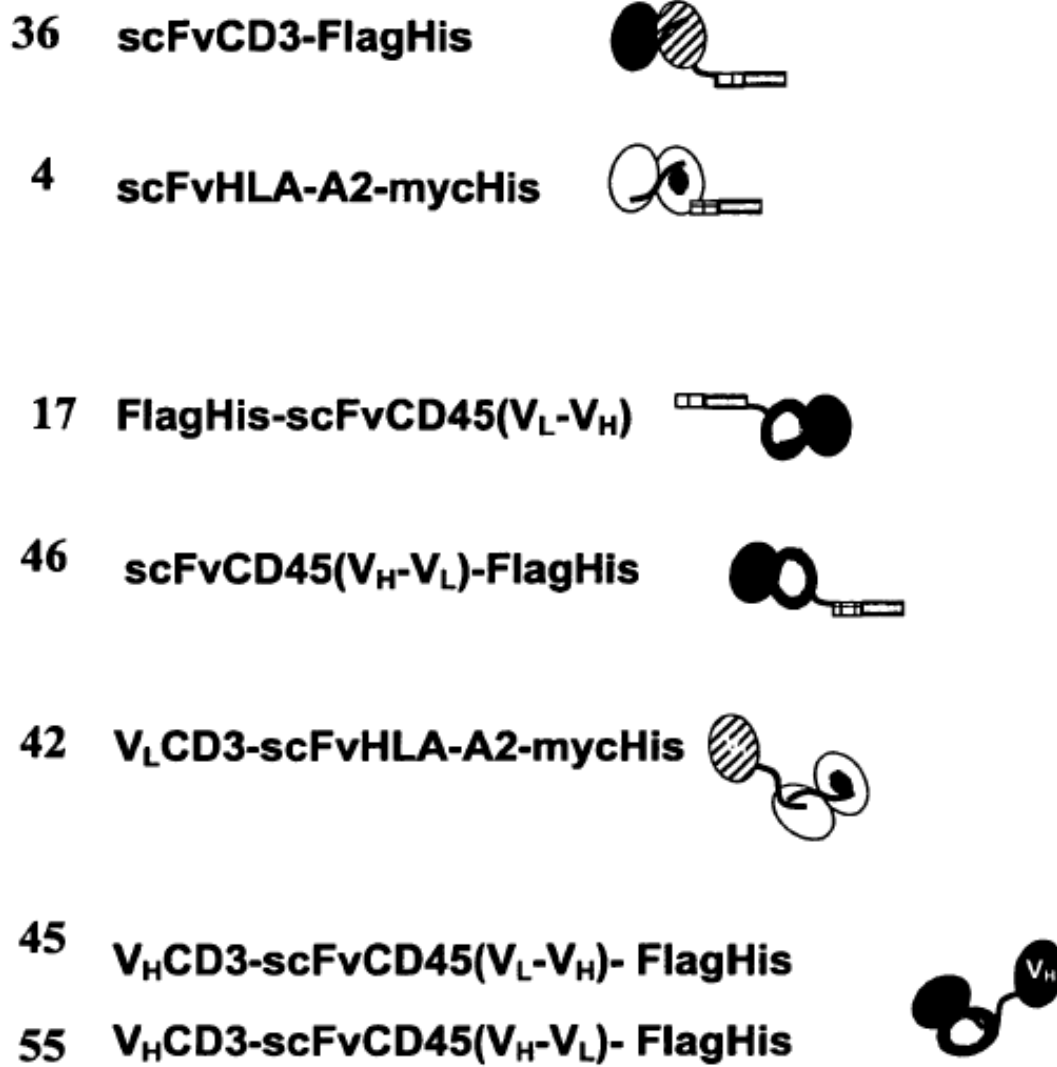


Figura 4

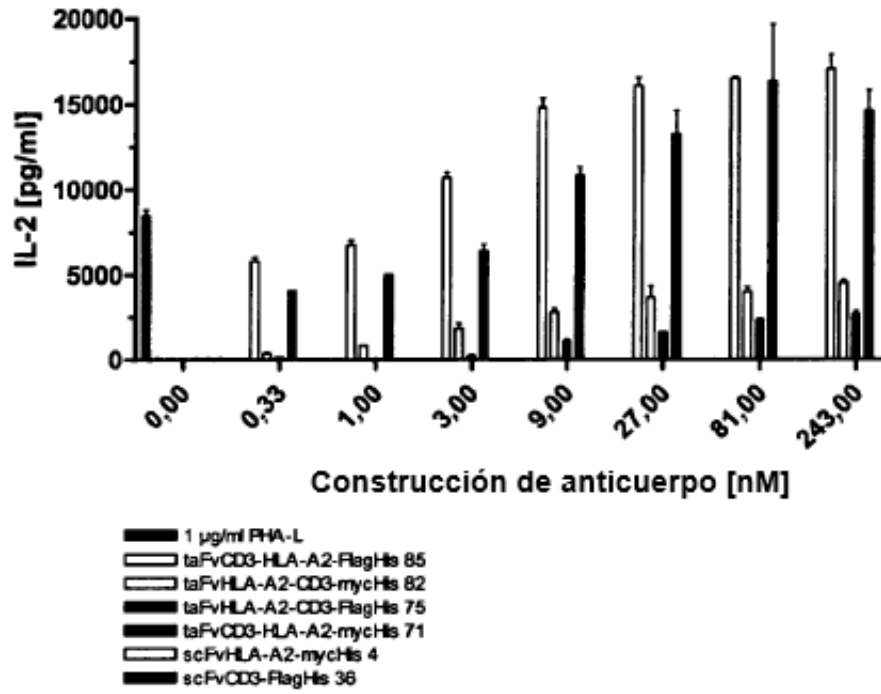


Figura 5

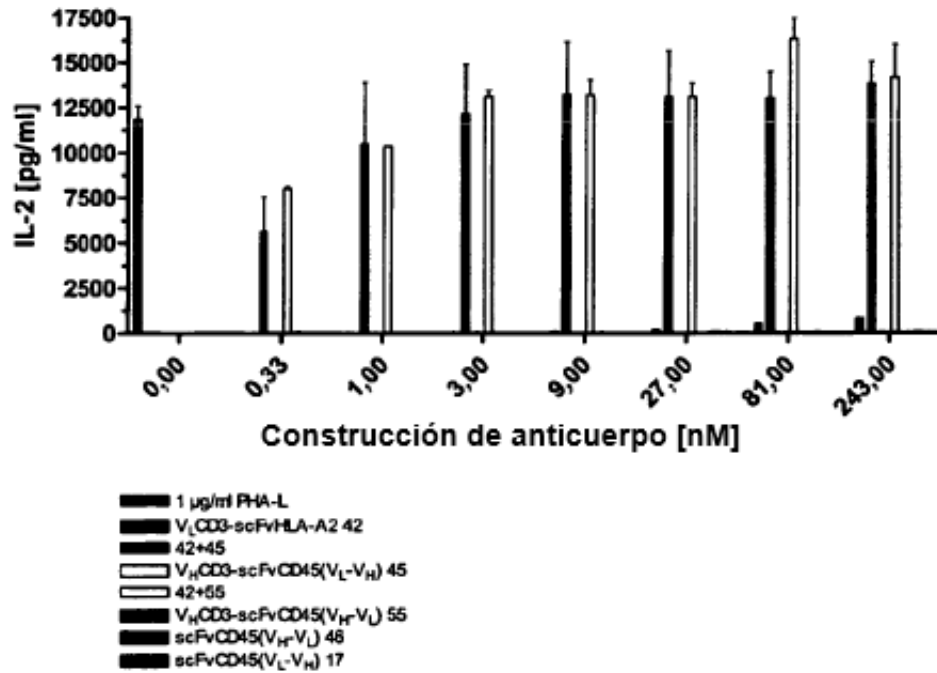


Figura 6

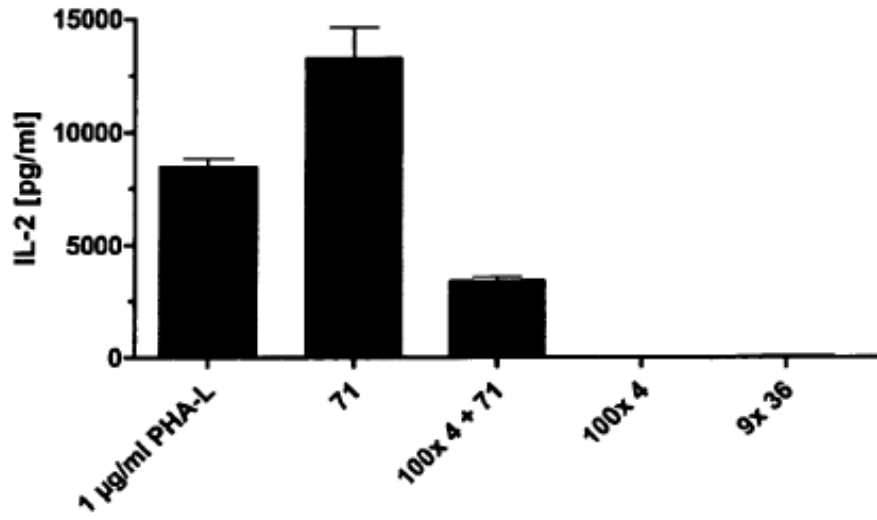


Figura 7

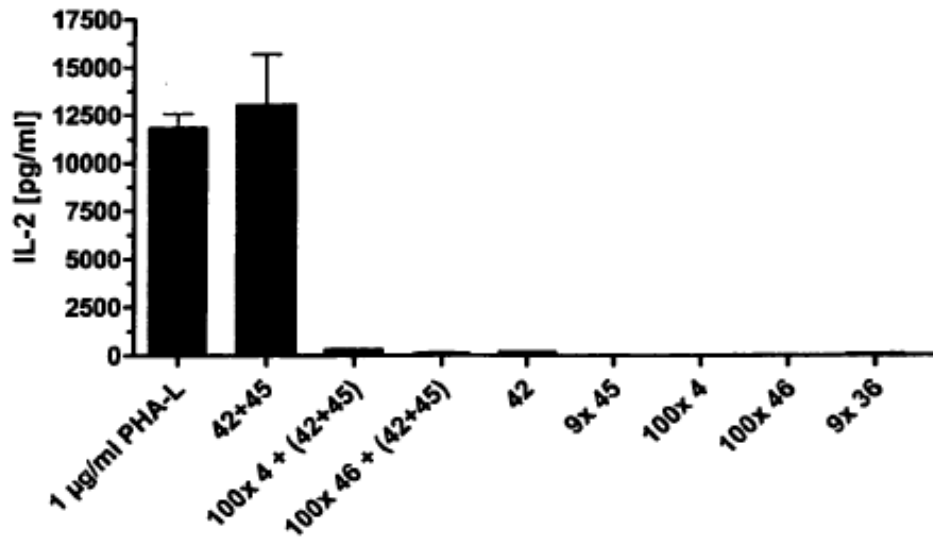


Figura 8

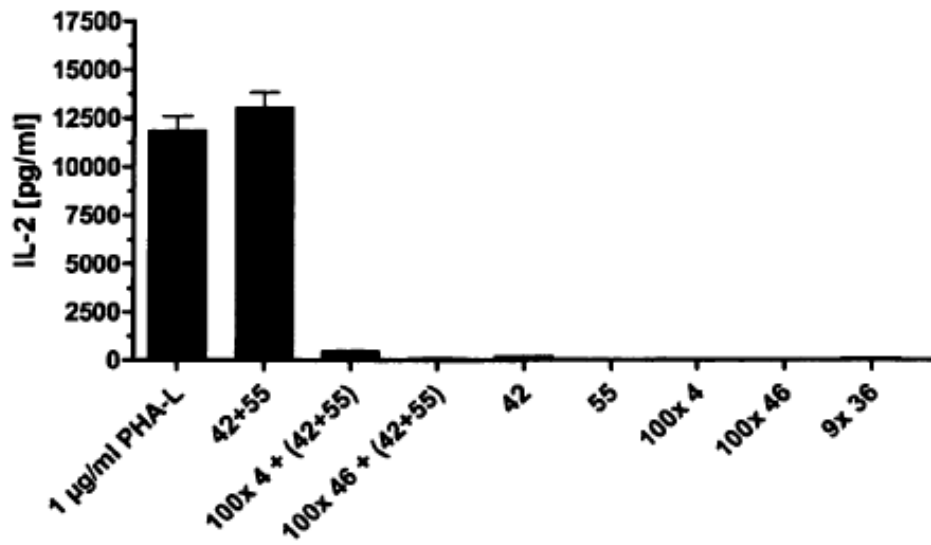
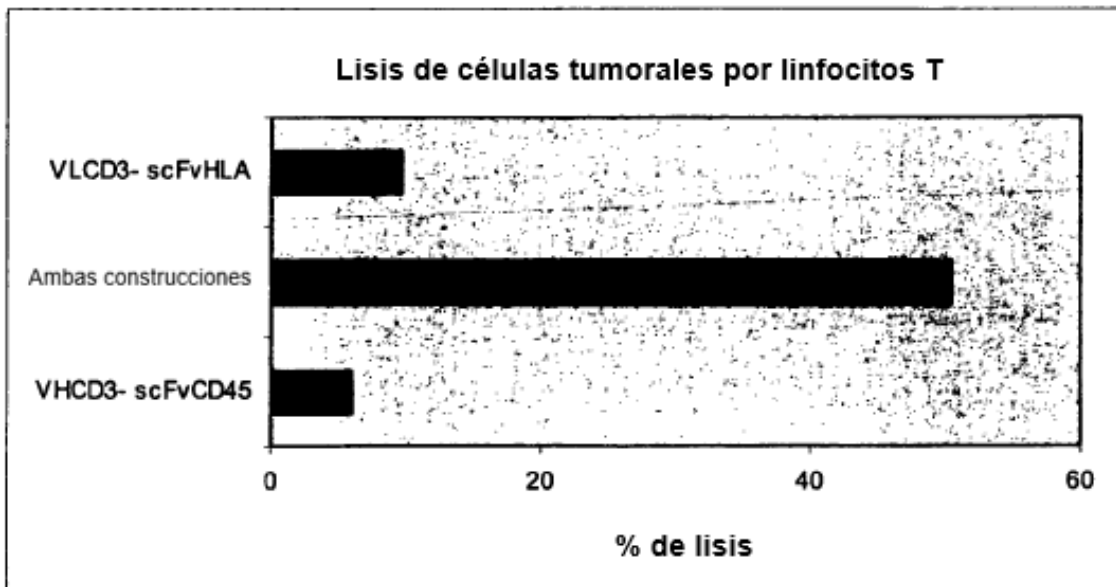


Figura 9





**Figura 10**

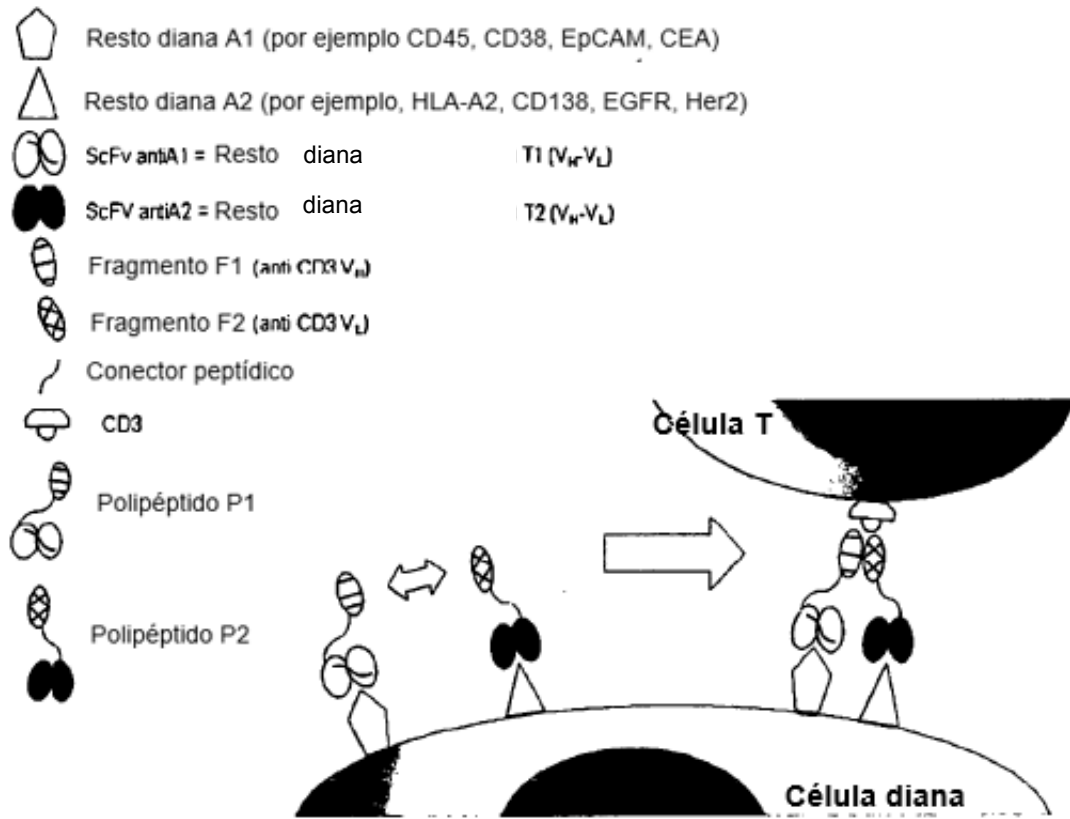


Figura 11

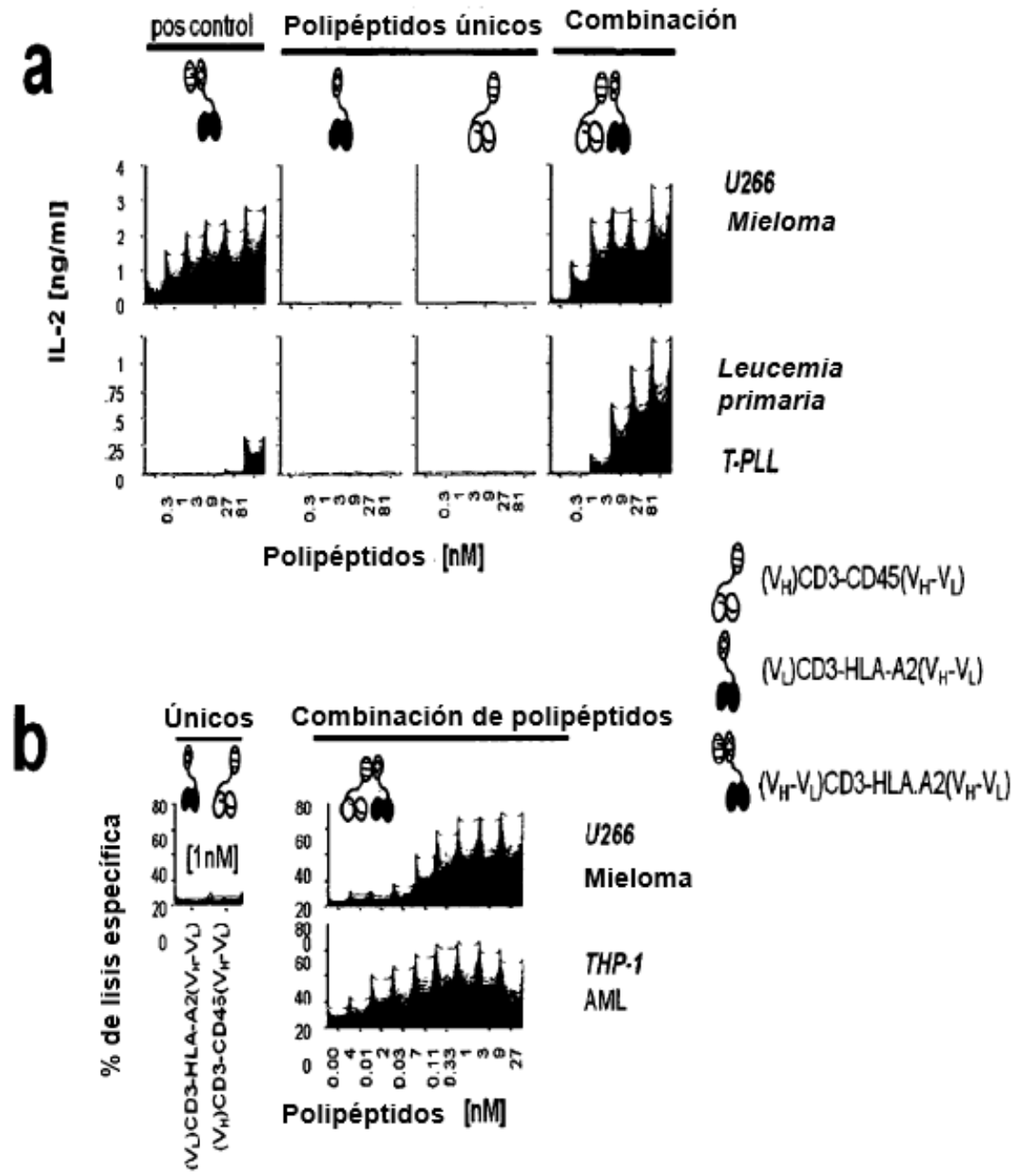


Figura 11

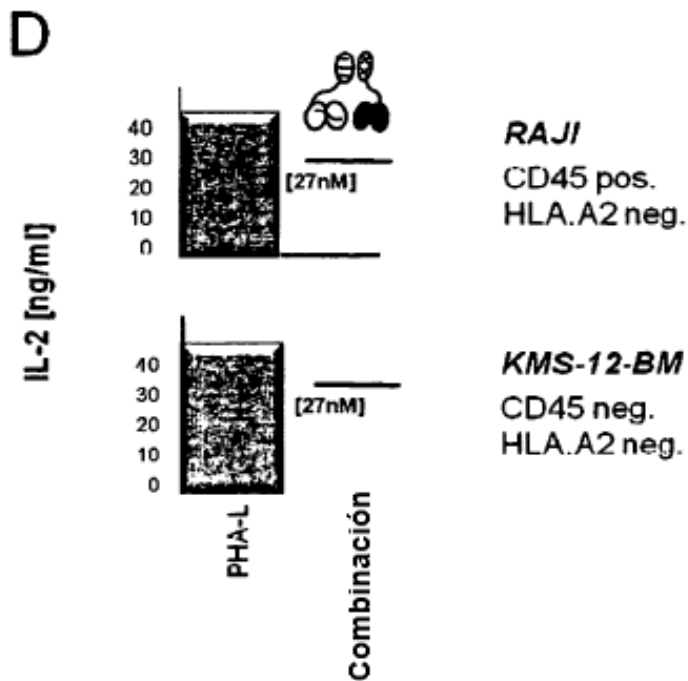
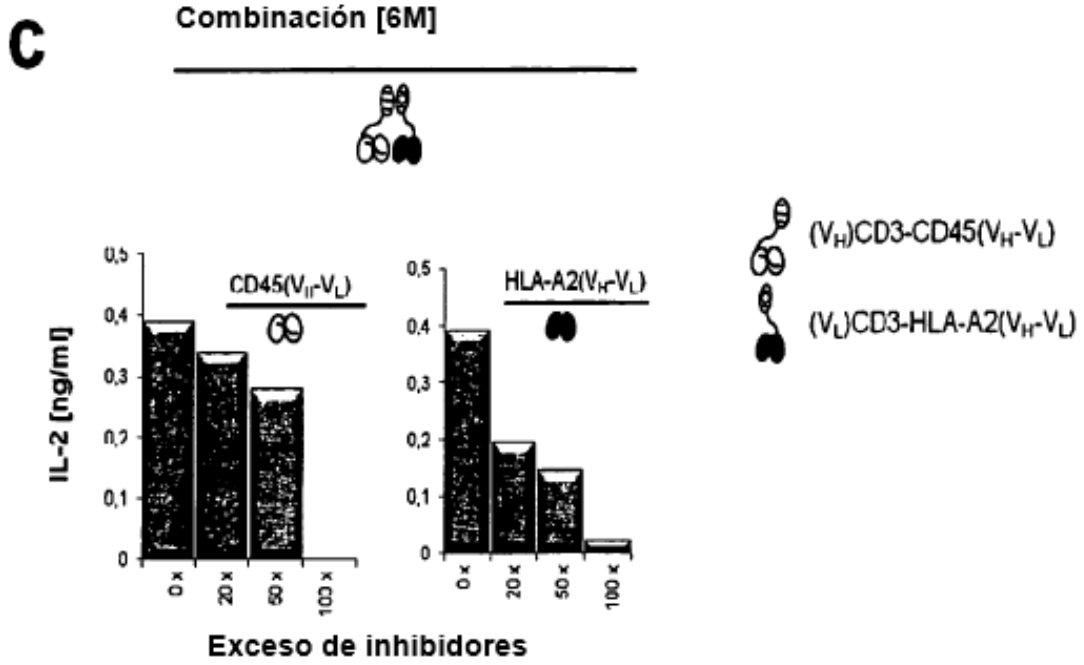


Figura 12A

**A**

Ratones Nod Scid-IL2R knockout transgénicos HLA-A2

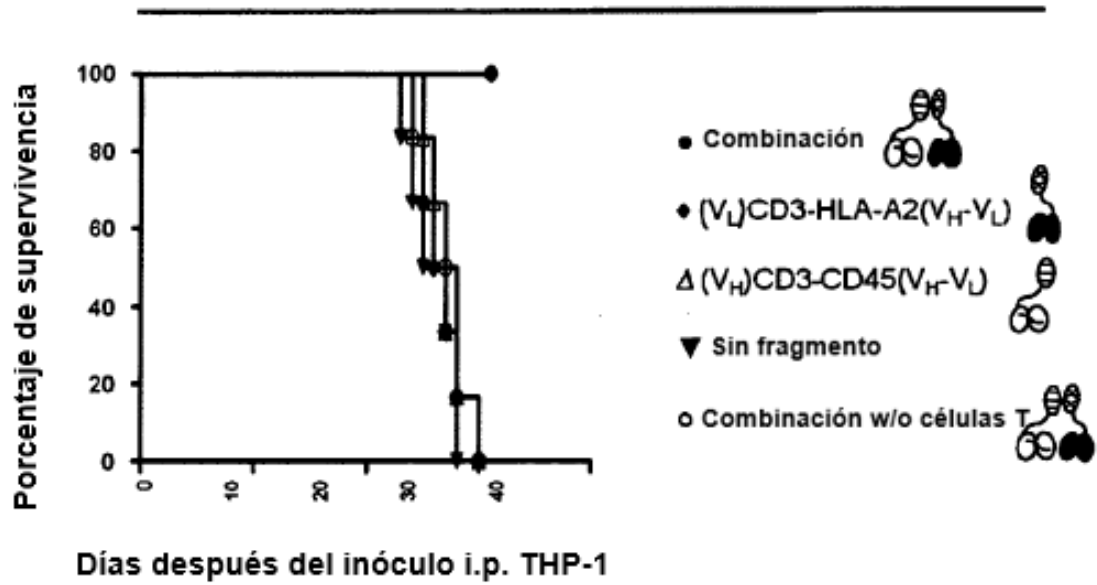


Figura 12B

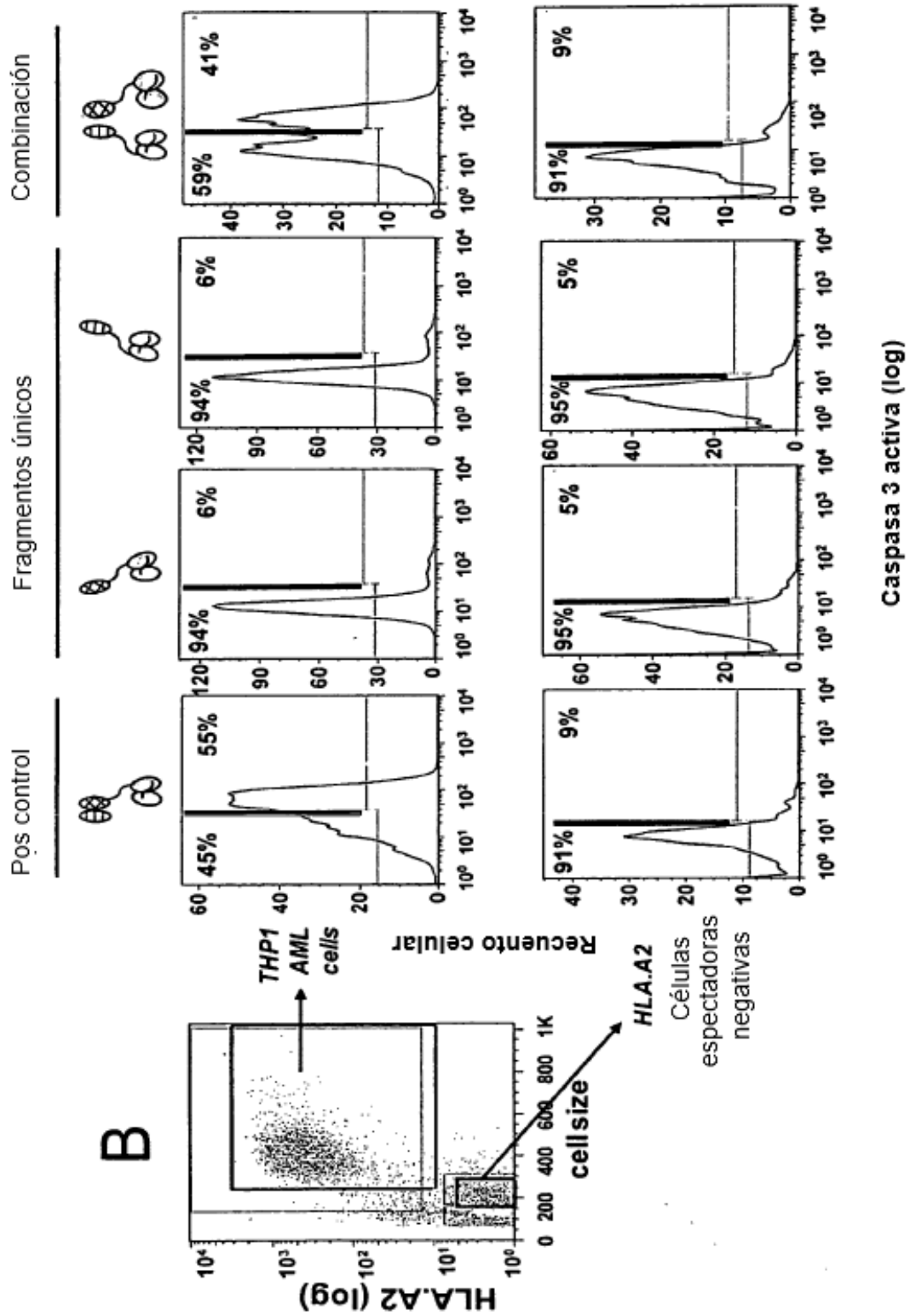


Figura 13

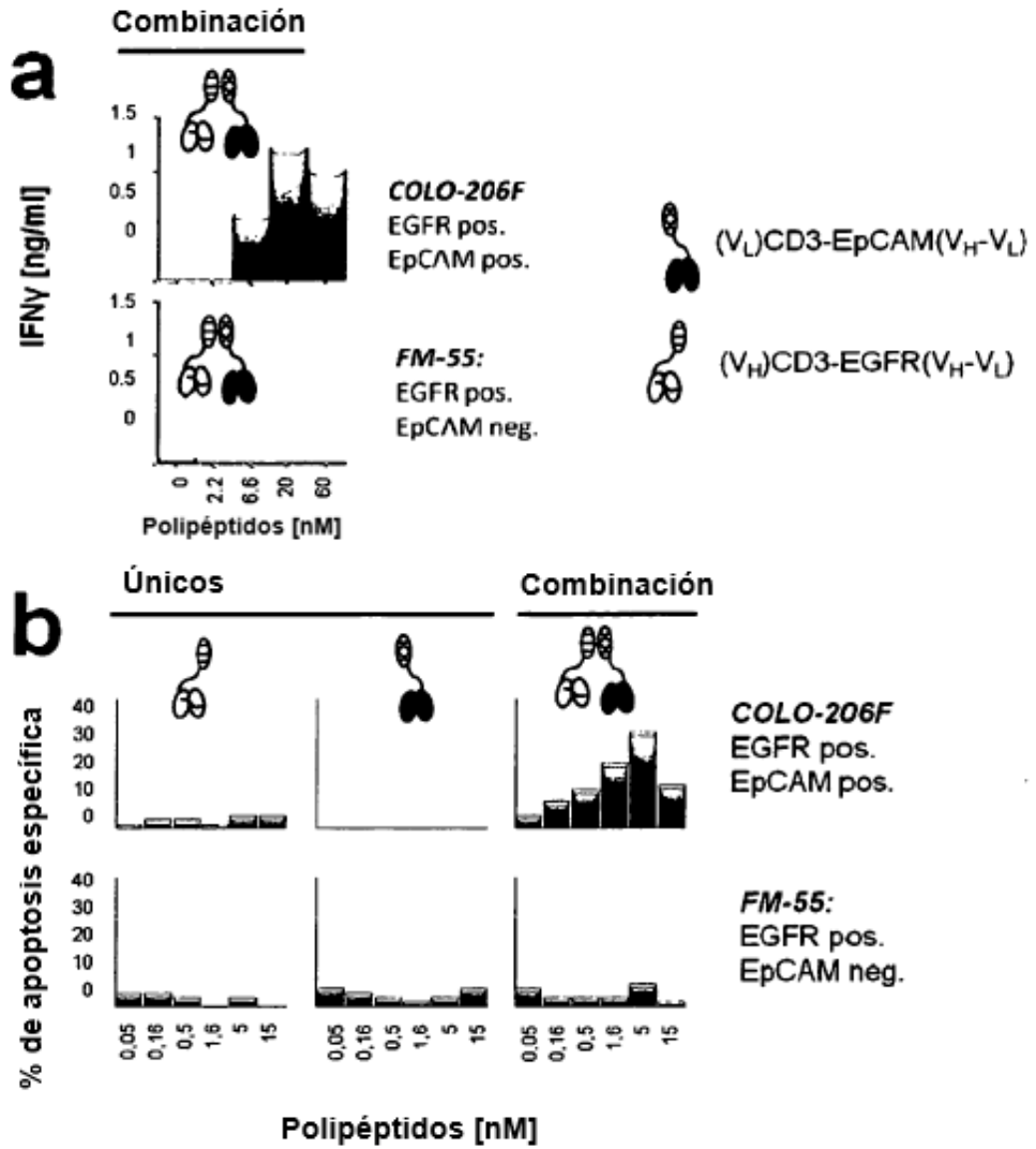


Figura 14

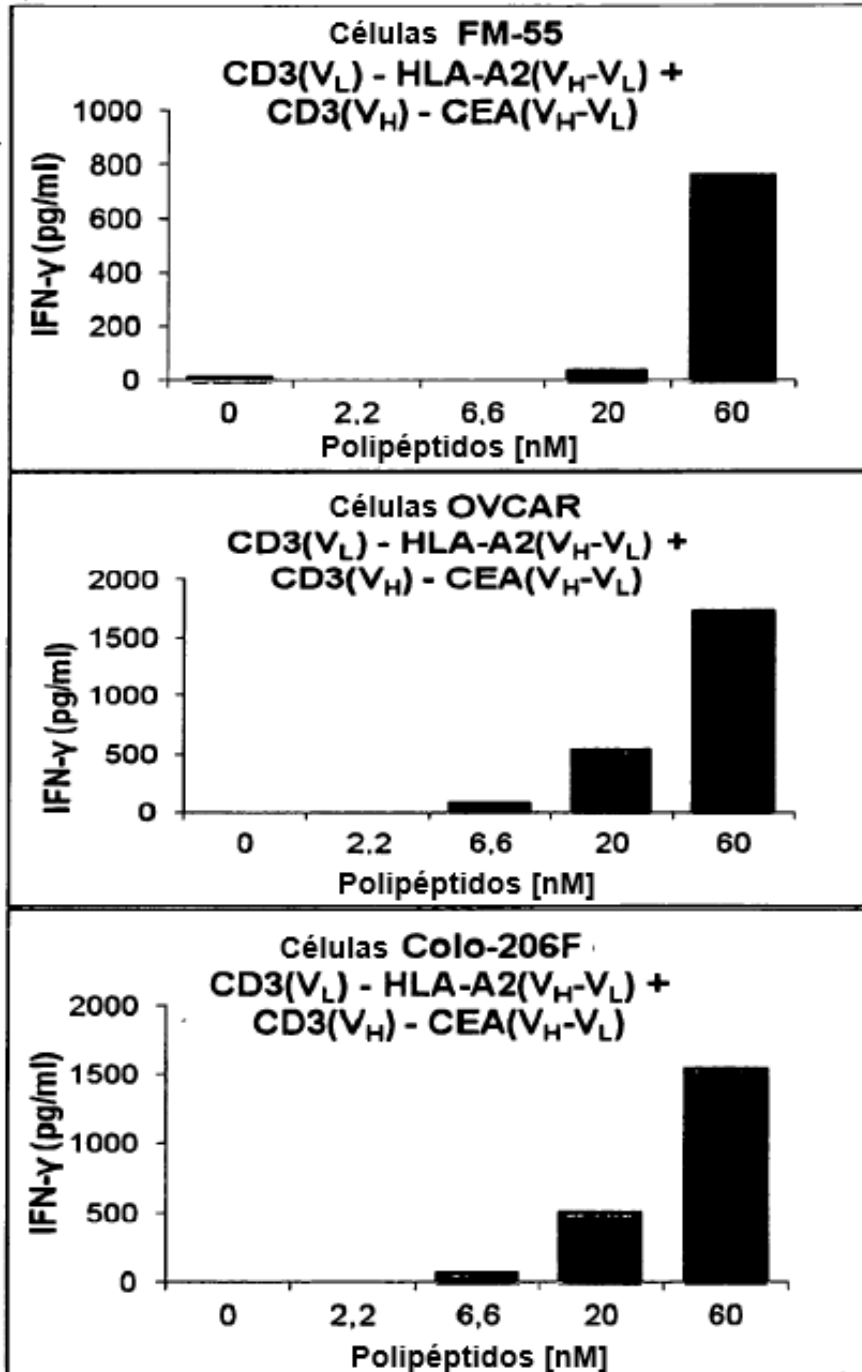


Figura 15

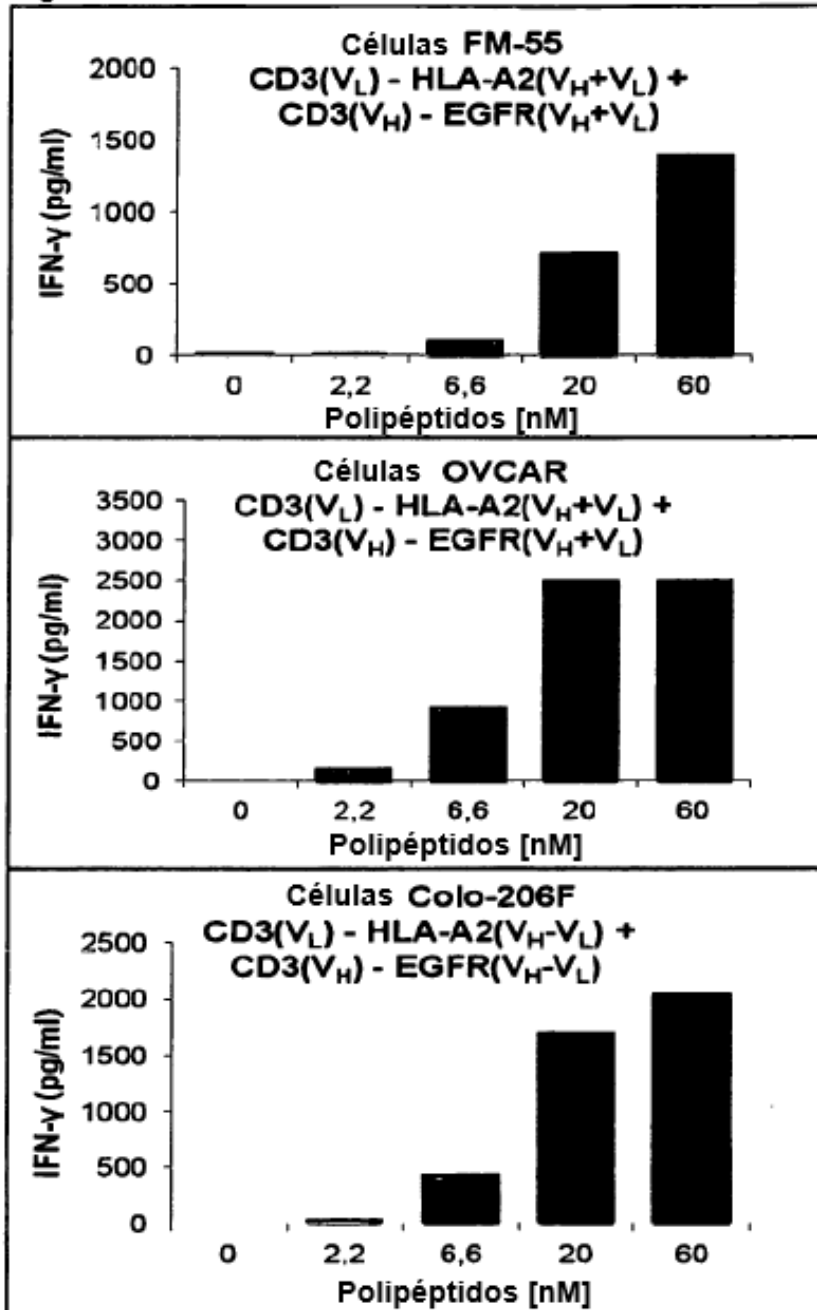




Figura 16

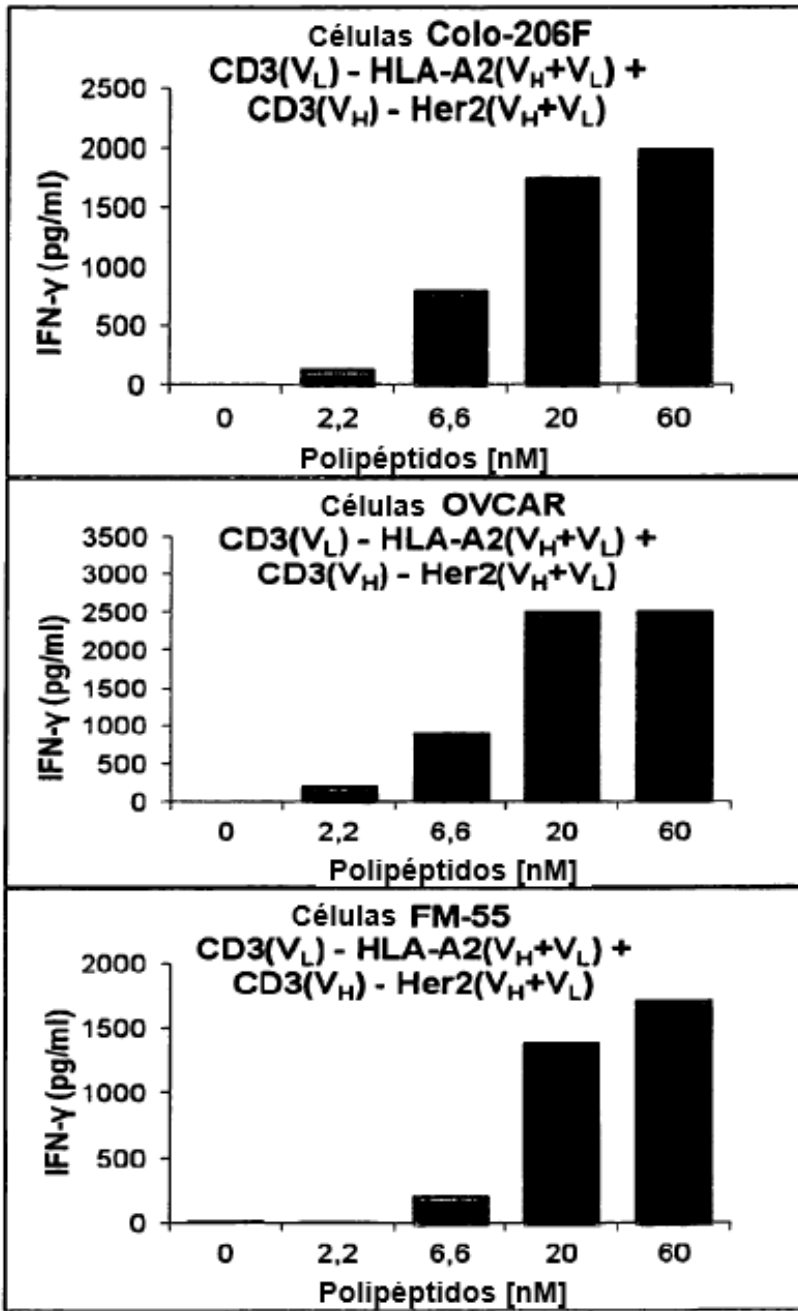


Figura 17

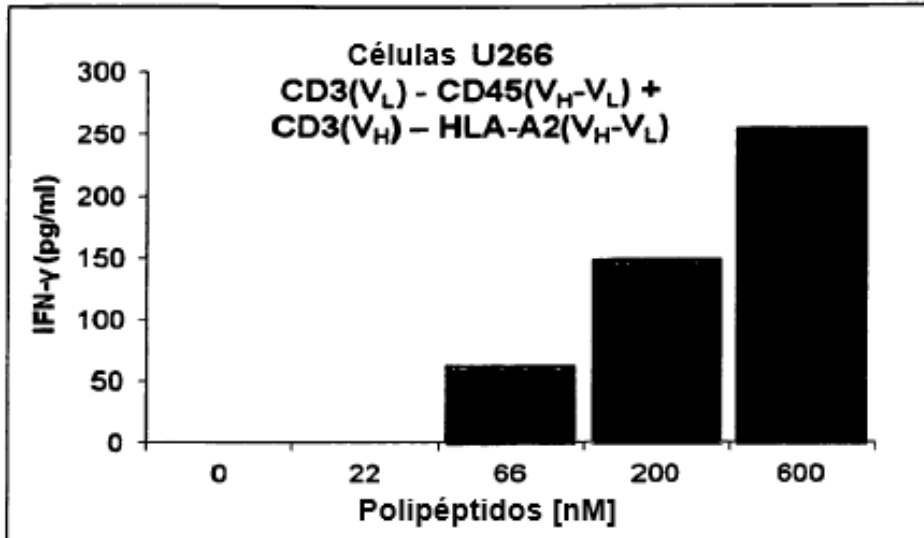


Figura 18

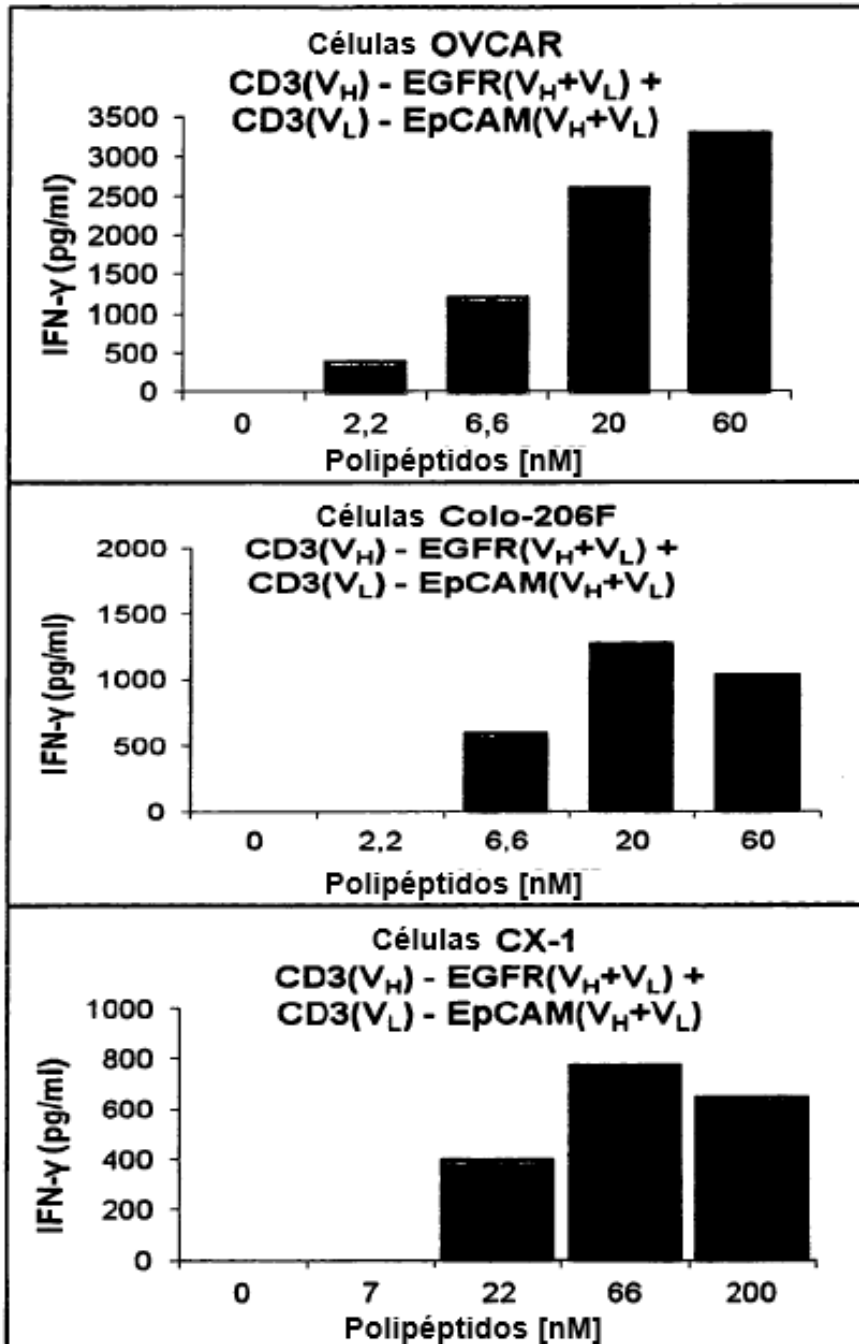


Figura 19

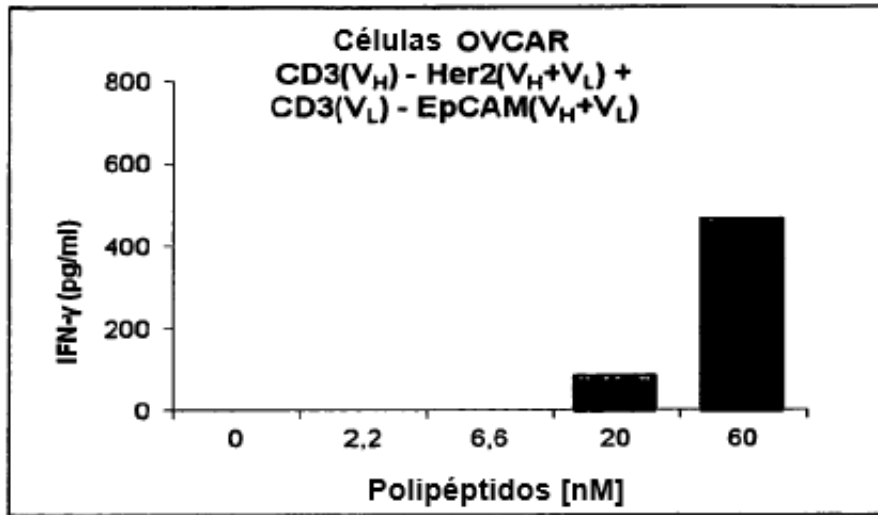


Figura 20

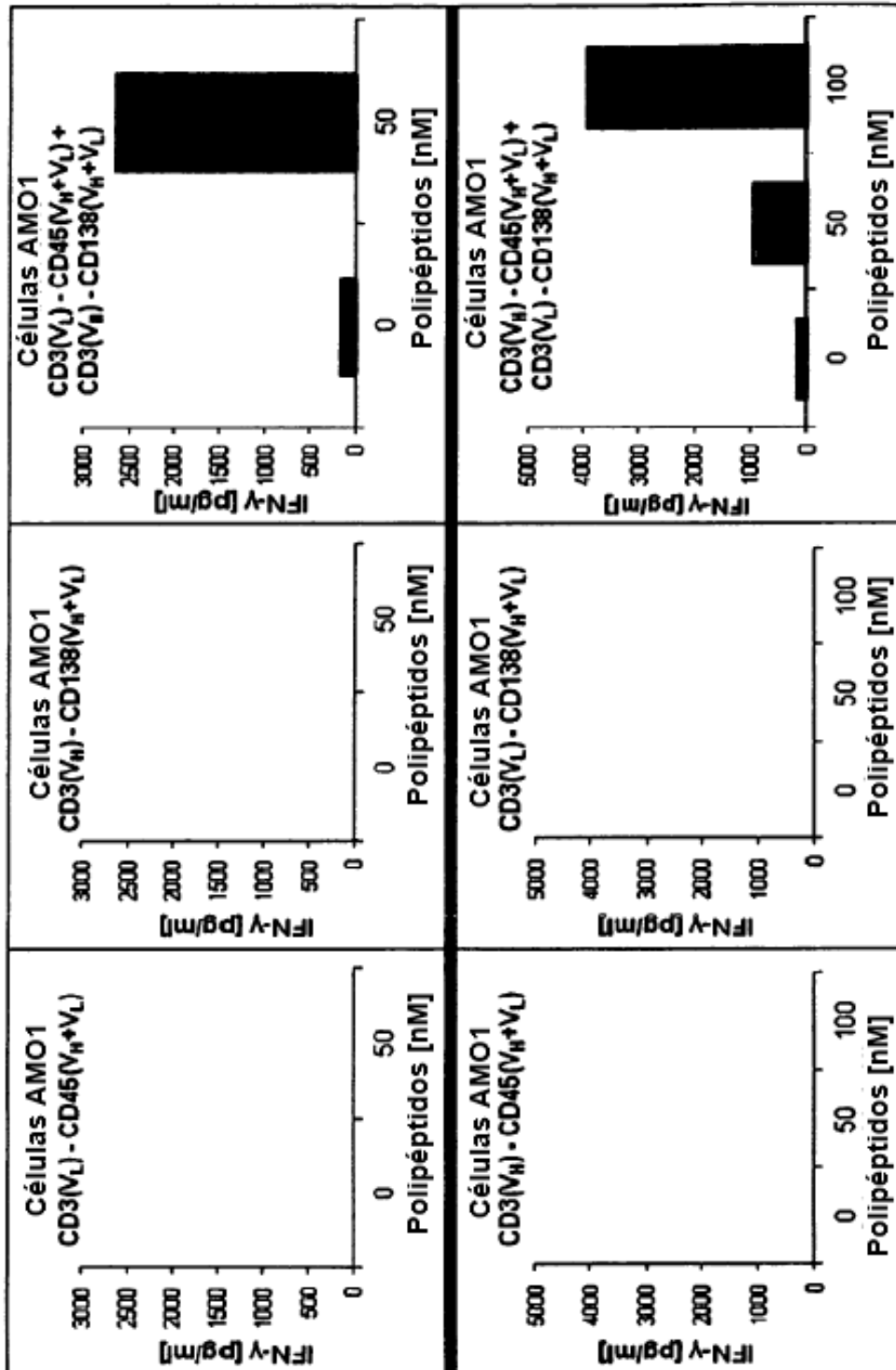


Figura 21

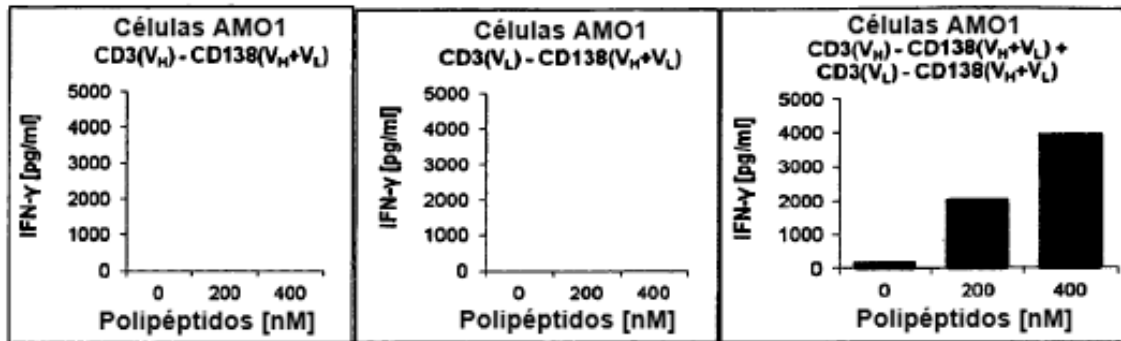


Figura 22

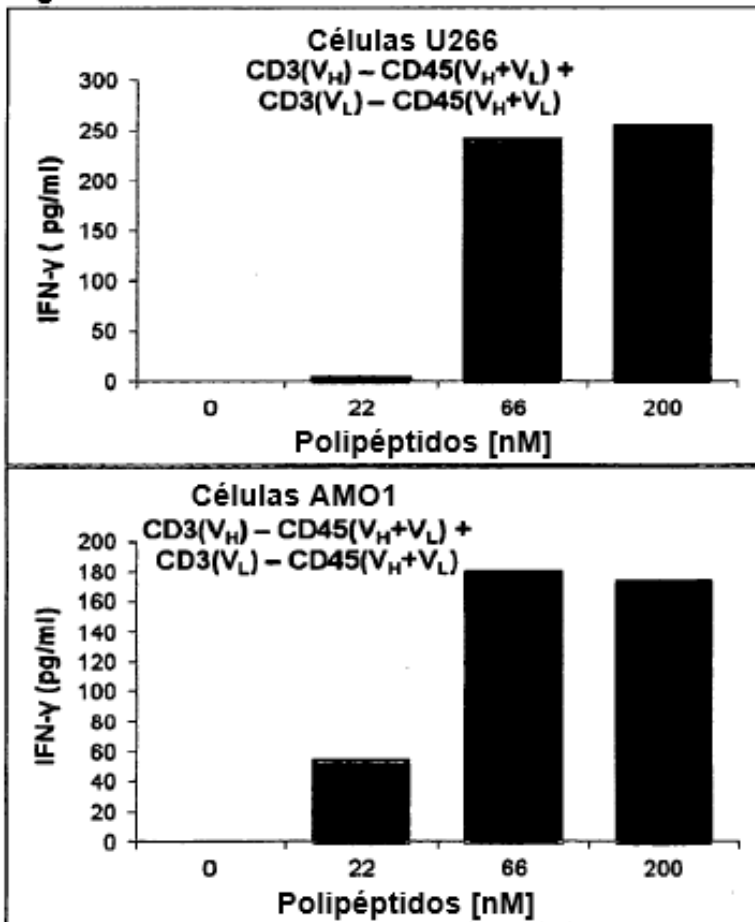


Figura 23

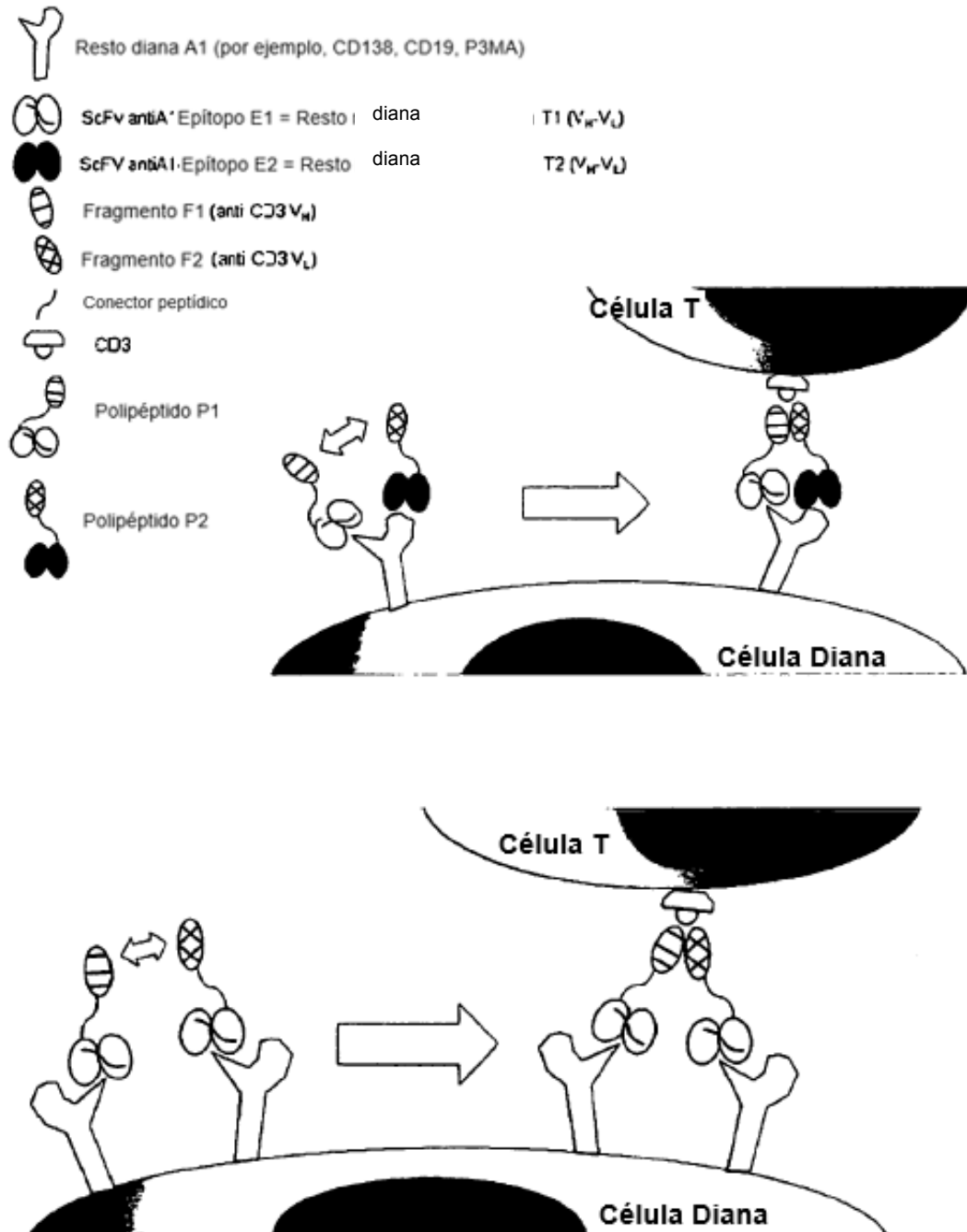


Figura 24

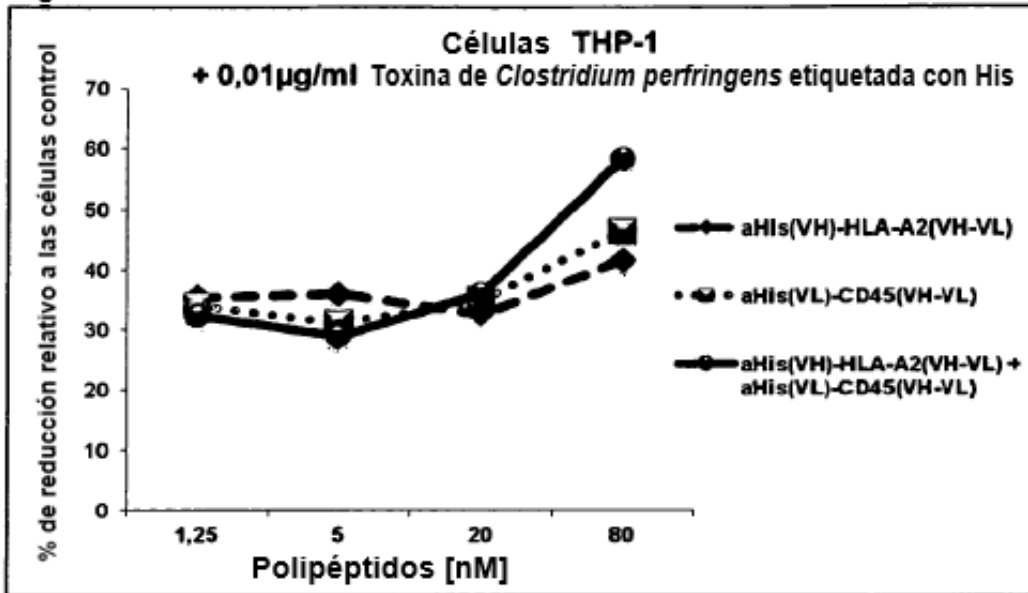


Figura 25

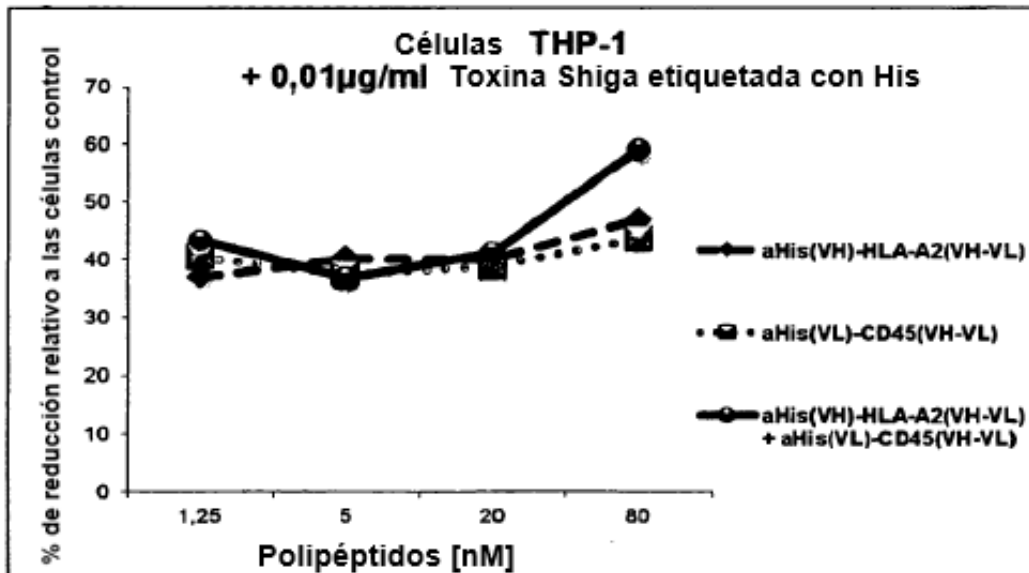




Figura 26

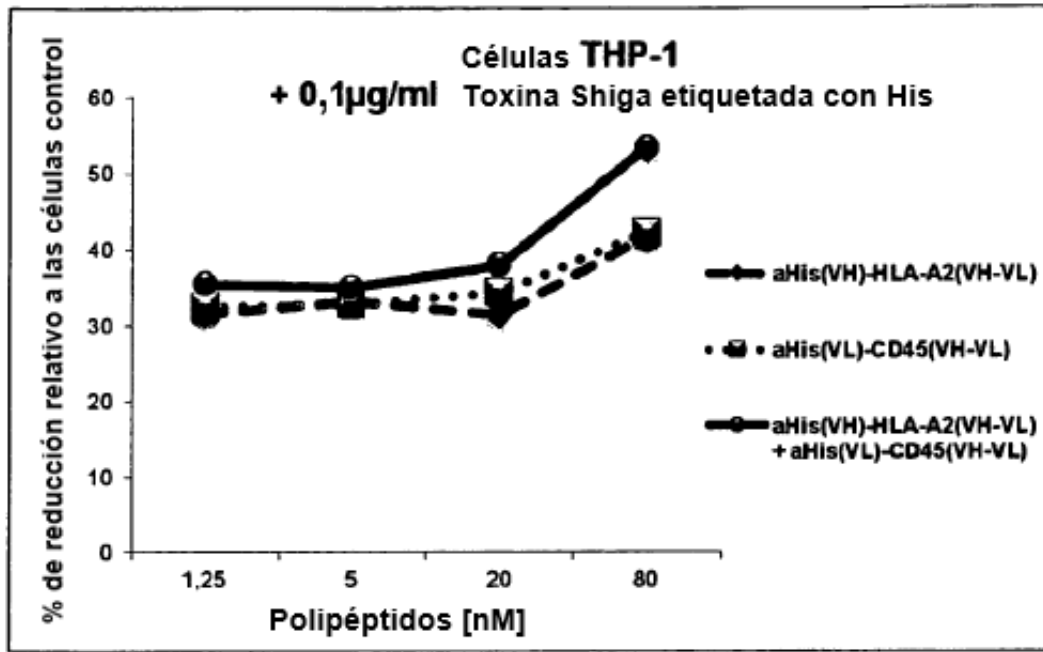


Figura 27

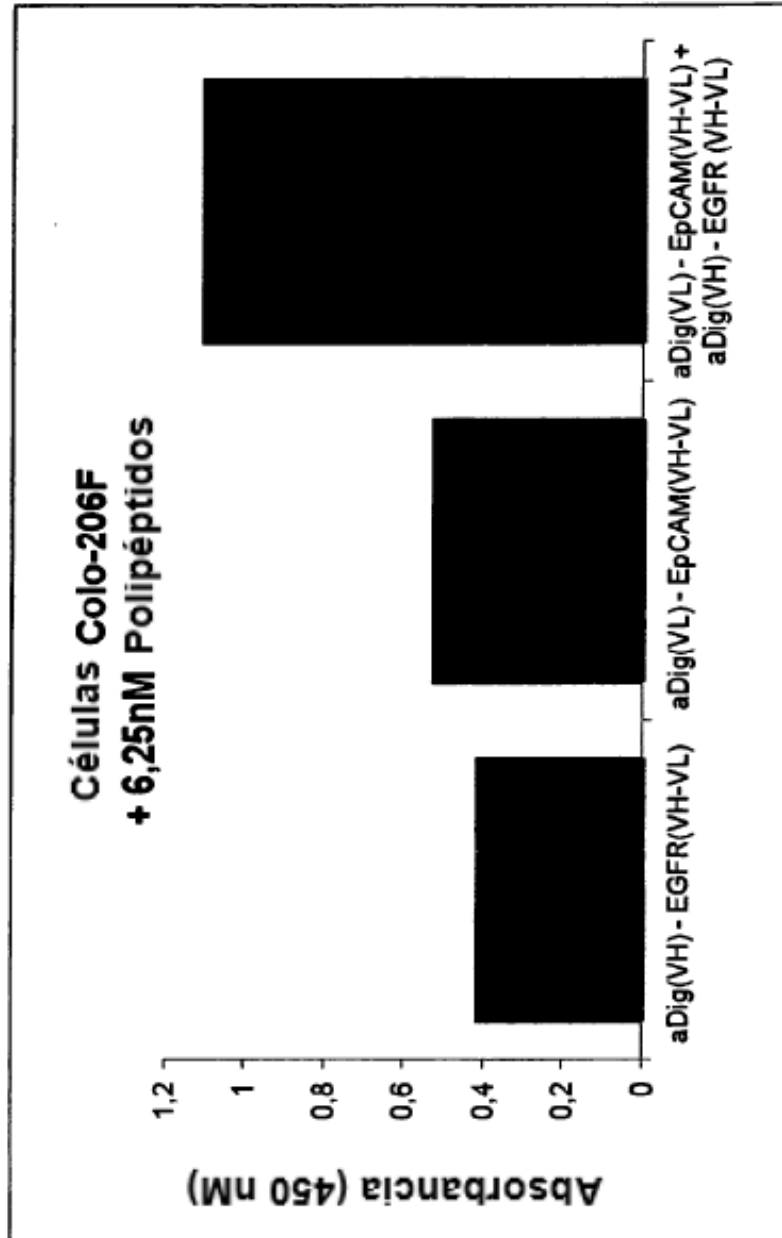


Figura 28

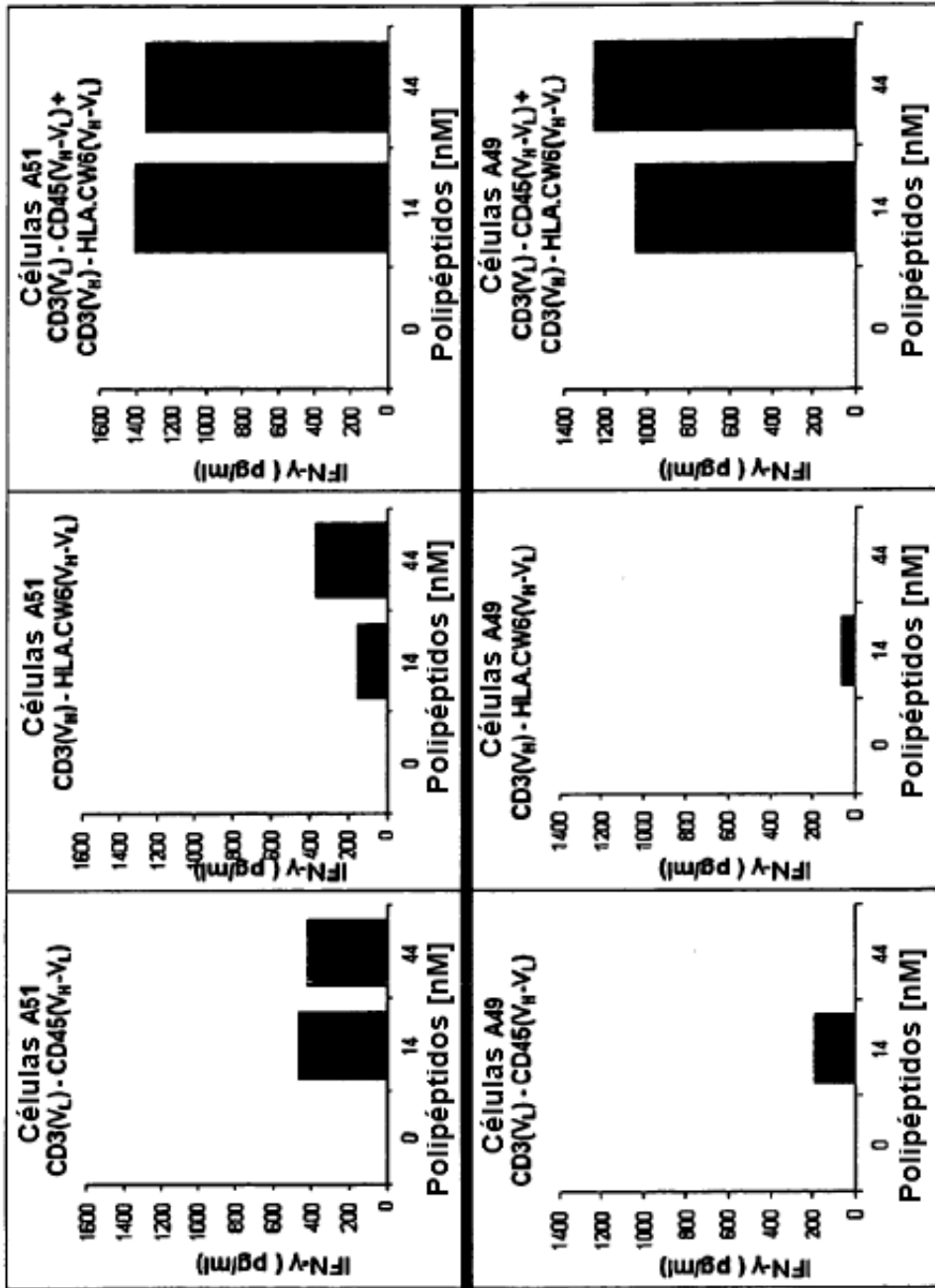


Figura 29

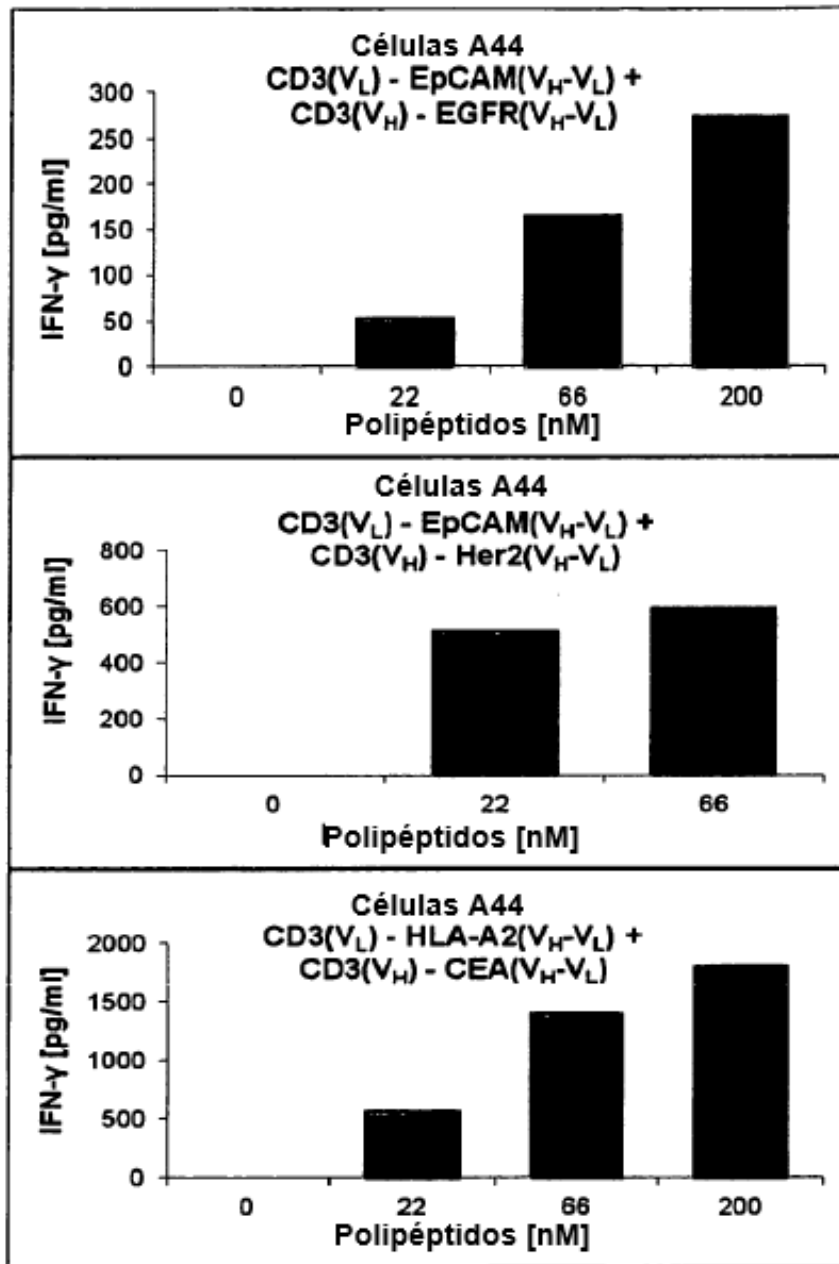


Figura 30

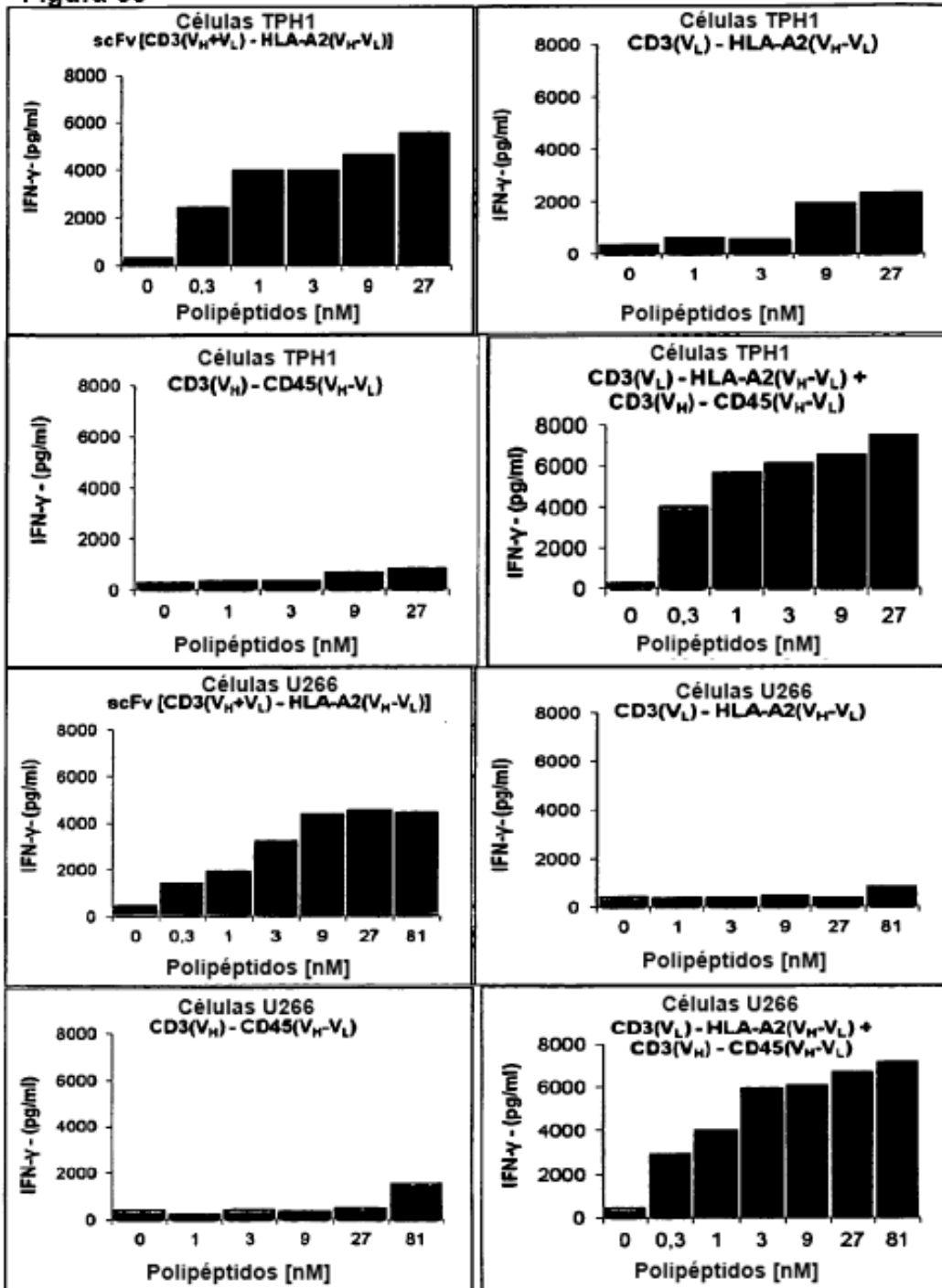


Figura 31

