(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 700 984**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/EP2013/077109**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096015**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13808036 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2935328**

(54) Título: **Proteínas multifuncionales que comprenden MHC de clase I multivalente unida por disulfuro**

(30) Prioridad:

21.12.2012 EP 12198904
08.07.2013 EP 13175469

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2019

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

GEORGES, GUY;
IMHOF-JUNG, SABINE;
KNOETGEN, HENDRIK y
SCHMITTNAEGEL, MARTINA

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas multifuncionales que comprenden MHC de clase I multivalente unida por disulfuro

En el presente documento se informa de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende un fragmento de anticuerpo y uno, dos o más componentes de MHC de clase I unidos por disulfuro y su uso para la supresión de células cancerosas o células infectadas por virus mediante la atracción dirigida de linfocitos T citotóxicos específicos de virus circulantes.

Antecedentes de la invención

La proteína MHC de clase I consiste en una cadena α (α-1 a 3 y un dominio transmembranario) y microglobulina β_2. Es poligénica (locus de 3 genes para la proteína MHC de clase I en el genoma haploide) lo que da lugar a seis cadenas α de proteína MHC de clase I diferentes (en seres humanos dos HLA-A, dos HLA-B, dos HLA-C). La MHC es además polimórfica. El alelo A*0201 del HLA-A humano es prevalente en aproximadamente de un 30 % a un 50 % de la población de raza blanca (véase, por ejemplo, Player, *et al.*, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19 (1996) 357-363).

El citomegalovirus humano huCMV (= herpesvirus humano 5, HHV-5) es uno de los virus humanos más grandes. Su genoma comprende alrededor de 230.000 pb de ADN bicatenario lineal y codifica más de 160 proteínas (véase, por ejemplo, Davison, A.J., *et al.*, J. Gen. Virol. 84 (2003) 17-28).

El CMV ha evolucionado para convertirse en un parásito sublime del genoma humano y es un inmunógeno potente y desencadena respuestas inmunitarias fuertes de todas las ramas del sistema inmunitario. Este virus parece estar entre los antígenos más inmunodominantes conocidos por el sistema inmunitario humano y estimula las respuestas de los linfocitos T $CD8^+$ de una magnitud sin precedentes.

La "latencia" del CMV depende de la supresión inmunitaria crónica de los virus CMV más que de un cambio en el patrón de transcripción vírica (véase, por ejemplo, Moss y Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464).

Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T $CD8^+$ no se dirigen de manera uniforme contra todas las proteínas del CMV, pero se centran en ellas. Las proteínas del CMV pp65 e IE-1 son las dianas predominantes (véase, por ejemplo, McLaughlin-Taylor, E., *et al.*, J. Med. Virol. 43 (1994) 103-110; Moss y Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464).

La frecuencia de linfocitos T específicos del CMV es muy alta, con frecuencias para péptidos individuales del orden de hasta un 1 a un 2 % del repertorio de linfocitos T $CD8^+$ totales (véase, por ejemplo, Moss y Khan, Human Immunology *supra*; Wills, M.R., *et al.*, J. Virol. 70 (1996) 7569-7579).

La respuesta de los linfocitos T $CD8^+$ específicos del CMV se incrementa notablemente con la edad y los tetrámeros de HLA-péptidos individuales se tiñen con frecuencia en un exceso de un 10 % del conjunto de linfocitos T $CD8^+$ totales (véase, por ejemplo, Khan, N., *et al.*, J. Immunol. 169 (2002) 1984-1992).

La respuesta de linfocitos T $CD8^+$ totales en donantes sanos de edad avanzada podría constituir aproximadamente un 50 % del repertorio de linfocitos T $CD8^+$.

Las enormes expansiones de linfocitos T $CD8^+$ a menudo están muy restringidas a nivel clonal y se estima que el CMV es la causa de al menos un 30 % de las expansiones de linfocitos T $CD8^+$ clonales que se observan en la sangre periférica con el envejecimiento. El recuento de linfocitos T $CD8^+$ totales es dos veces más alto en sujetos seropositivos para el CMV mayores de 60 años en comparación con una cohorte seronegativa para CMV (véase, por ejemplo, Looney, R.J., *et al.*, Clin. Immunol. 90 (1999) 213-219).

Se informa de una fusión de HLA soluble y microglobulina β_2 por Mottez *et al.* (Eur. J. Immunol. 21 (1991) 467-471); Godeau *et al.* (J. Biol. Chem. 267 (1992) 24223-24229) y Mage *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 10658-10662). Se informa de una fusión de péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 por Mottez *et al.* (J. Exp. Med. 181 (1995) 493-502). Se informa de una fusión de una cadena pesada de inmunoglobulina con HLA soluble y microglobulina β_2 coexpresada por Dal Porto *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6671-6675). Se describe una proteína multifuncional tetramérica de péptido-HLA soluble biotinilado y microglobulina β_2 con estreptavidina acoplada químicamente a un Fab por Robert *et al.* (Eur. J. Immun. 30 (2000) 3165-3170). Se informa de un Fab acoplado químicamente con una fusión de péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 por Robert *et al.* (Cancer Immunity 1 (2001) 2). Se informa de una fusión de un péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 a una cadena pesada de anticuerpo monoclonal murino por Greten *et al.* (J. Immunol. Methods 271 (2002) 125-135). Se informa de una expresión en *E. coli* de fusiones de scFv sin péptido, replegamiento *in vitro* y carga de péptidos por Lev *et al.* (J. Immunol. 169 (2002) 2988-2996; Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 9051-9056) y Novak *et al.* (Int. J. Cancer 120 (2006) 329-336). Se informa del uso de MHC soluble biotinilado cargado con péptidos y acoplado a anticuerpos Fab o scFv fusionados con estreptavidina por Mous *et al.* (Leukemia 20 (2006) 1096-1102).

En el documento WO 2005/099361 se informa de conjugados péptido-anticuerpo de MHC de clase I con microglobulina beta$_2$ modificada. Los conjugados ejemplares como se informa en el documento WO 2005/099361 se obtienen mediante conjugación *in vitro* de la cadena alfa de la proteína multifuncional MHC (HLA) o mediante la coexpresión a partir de genes separados en la misma célula.

En el documento US 2004/0091488 se informa de construcciones antigénicas de antígenos de la proteína multifuncional principal de histocompatibilidad de clase I con moléculas transportadoras específicas. Estos polipéptidos de fusión notificados carecen de la región bisagra.

En el documento WO 99/13095, el uso de moléculas de MHC/IG cargadas con péptidos quiméricas multivalentes para detectar, activar o suprimir respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T específicas de antígeno. En el documento WO 02/102299 se informa de procedimientos y composiciones farmacéuticas para la reducción inmunitaria, particularmente útiles en el tratamiento del cáncer. Oelke, M., *et al.* (Nat. Med. 9 (2003) 619-624) informan de la inducción y expansión *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno por células presentadoras de antígeno artificiales recubiertas con HLA-Ig. En el documento WO 2012/175508 se informa de la supresión de células diana por linfocitos T citotóxicos circulantes específicos de virus usando MHC de clase I que comprenden complejos. Robert, B., *et al.* (Eur. J. Immunol. 30 (2000) 3165-3170) informan de que los tetrámeros del MHC de clase I conjugados con anticuerpos pueden tener como diana células tumorales para lisis específica por los linfocitos T.

Sumario de la invención

En el presente documento se informa de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende uno, dos o más, en un modo de realización uno, en otro modo de realización dos o cuatro, dominios presentadores de antígeno como primera parte, una región Fc de anticuerpo como segunda parte, y al menos un sitio de unión a antígeno que se deriva de un anticuerpo y que se une específicamente a un antígeno diana como tercera parte.

Con la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento, linfocitos T citotóxicos circulantes específicos de virus (linfocitos T de memoria y/o linfocitos T efectores) existentes de un individuo se pueden dirigir a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte derivada de anticuerpo de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro. Posteriormente, al revestir estas células con un complejo MHC de clase I, se imita una infección vírica aguda por el péptido derivado de virus unido a la proteína multifuncional de la proteína MHC de clase I y se atraen células citotóxicas, lo que da como resultado la supresión de la célula dirigida.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno, dos o más de dos dominios presentadores de antígeno,
- exactamente una región Fc de anticuerpo, y
- uno o más sitios de unión a antígeno,

en la que los dominios presentadores de antígeno comprenden independientemente el uno del otro en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el sitio o sitios de unión a antígeno se unen a un antígeno de superficie de células cancerosas o un antígeno de superficie de células infectadas por virus, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene al menos dos residuos de cisteína no naturales que forman un enlace disulfuro intracatenario/interdominio.

En un modo de realización, un residuo de cisteína no natural en el dominio presentador de antígeno está en el conector entre el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína no natural está en uno de los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I. En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro (la posición 11 corresponde a la posición 2 del conector; la posición 227 corresponde a la posición 84 de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 140).

En un modo de realización, un residuo de cisteína no natural en el dominio presentador de antígeno está en el conector entre el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína no natural está en uno de los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I. En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro (la posición 11 corresponde a la posición 2 del conector; la posición 108 corresponde a la posición 84 de SEQ ID NO: 71).

En un modo de realización, un residuo de cisteína no natural en el dominio presentador de antígeno está en el conector entre el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína no natural está en la microglobulina β_2.

En un modo de realización, un residuo de cisteína no natural en el dominio presentador de antígeno está en el conector entre el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína no natural está en el conector entre la microglobulina β_2 y el dominio extracelular α1 de una molécula de MHC de clase I.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende un primer y segundo polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, por medio de lo cual el sitio de unión a antígeno o uno de los sitios de unión a antígeno comprende el primer polipéptido de la región Fc y el segundo sitio de unión a antígeno, si está presente, comprende el segundo polipéptido de la región Fc.

En un modo de realización, el sitio de unión a antígeno comprende i) un par (cognado) de una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, por medio de lo cual las cadenas individuales pueden ser cadenas naturales o cadenas modificadas (sustituidas, mutadas o con intercambio de dominios), o ii) un polipéptido de fusión scFv que comprende en la dirección N a C terminal un fragmento de anticuerpo scFv y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo, o iii) un polipéptido de fusión scFab que comprende en la dirección N a C terminal un scFab y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo.

En un modo de realización, los sitios de unión a antígeno comprenden independientemente unos de otros i) un par (cognado) de una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, por medio de lo cual las cadenas individuales pueden ser cadenas naturales o cadenas modificadas (sustituidas, mutadas o con intercambio de dominios), o ii) un polipéptido de fusión scFv que comprende en la dirección N a C terminal un fragmento de anticuerpo scFv y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo, o iii) un polipéptido de fusión scFab que comprende en la dirección N a C terminal un scFab y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo.

En un modo de realización i) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N de la cadena pesada o al extremo N de la cadena ligera de un sitio de unión a antígeno (si está presente un dominio presentador de antígeno), o ii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N de la cadena pesada o a cada extremo N de la cadena ligera de cada sitio de unión a antígeno (si están presentes dos dominios presentadores de antígeno), o iii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo C de la cadena pesada o al extremo C de la cadena ligera del sitio de unión al antígeno (si está presente un dominio presentador de antígeno), o iv) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo C de la cadena pesada o a cada extremo C de la cadena ligera de cada sitio de unión a

antígeno (si están presentes dos dominios presentadores de antígeno), o v) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFv (si está presente un dominio presentador de antígeno), o vi) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFv (si están presentes dos dominios presentadores de antígeno), o vii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFab (si está presente un dominio presentador de antígeno), o viii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFab (si están presentes dos dominios presentadores de antígeno), o ix) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc (si está presente un dominio presentador de antígeno), o x) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del primer polipéptido de la región Fc y un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc (si están presentes dos dominios presentadores de antígeno).

En un modo de realización, el antígeno de superficie celular es un antígeno de superficie de células cancerosas. En un modo de realización, el antígeno de superficie de células cancerosas es el proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP).

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro covalente.

En un modo de realización, el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido derivado de virus. En un modo de realización, el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T $CD8^+$.

En un modo de realización, el virus se selecciona de citomegalovirus humano, adenovirus, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, herpesvirus humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus humano de tipo 16, papilomavirus humano de tipo 18, papilomavirus humano de tipo 31, papilomavirus humano de tipo 33, papilomavirus humano de tipo 35, papilomavirus humano de tipo 39, papilomavirus humano de tipo 45, papilomavirus humano de tipo 51, papilomavirus humano de tipo 52, papilomavirus humano de tipo 56, papilomavirus humano de tipo 58, papilomavirus humano de tipo 59, papilomavirus humano de tipo 68, papilomavirus humano de tipo 73, papilomavirus humano de tipo 82, virus linfótropo de linfocitos T humano de tipo I, virus de la gripe A humano, virus de la gripe B humano, virus de la variolovacuna, virus del dengue.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se selecciona de los péptidos NLVPMVATV (SEQ ID NO: 01), VTEHDTLLY (SEQ ID NO: 02), NTDFRVLEL (SEQ ID NO: 03), CVETMCNEY (SEQ ID NO: 04), VLEETSVML (SEQ ID NO: 05), NLVPMVATV (SEQ ID NO: 06), RIFAELEGV (SEQ ID NO: 07), IIYTRNHEV (SEQ ID NO: 08), VLAELVKQI (SEQ ID NO: 09), AVGGAVASV (SEQ ID NO: 10), TVRSHCVSK (SEQ ID NO: 11), IMREFNSYK (SEQ ID NO: 12), GPISHGHVLK (SEQ ID NO: 13), ATVQGQNLK (SEQ ID NO: 14), VYALPLKML (SEQ ID NO: 15), AYAQKIFKIL (SEQ ID NO: 16), QYDPVAALF (SEQ ID NO: 17), YVKVYLESF (SEQ ID NO: 18), DIYRIFAEL (SEQ ID NO: 19), VFETSGGLVV (SEQ ID NO: 20), KARDHLAVL (SEQ ID NO: 21), QARLTVSGL (SEQ ID NO: 22), KARAKKDEL (SEQ ID NO: 23), QIKVRVDMV (SEQ ID NO: 24), RRRHRQDAL (SEQ ID NO: 25), ARVYEIKCR (SEQ ID NO: 26), KMQVIGDQY (SEQ ID NO: 27), NVRRSWEEL (SEQ ID NO: 28), CPSQEPMSIYVY (SEQ ID NO: 29), KPGKISHIMLDVA (SEQ ID NO: 30), ELRRKMMYM (SEQ ID NO: 31), IPSINVHHY (SEQ ID NO: 32), FEQPTETPP (SEQ ID NO: 33), YAYIYTTYL (SEQ ID NO: 34), QEFFWDANDIY (SEQ ID NO: 35), YEQHKITSY (SEQ ID NO: 36), QEPMSIYVY (SEQ ID NO: 37), SEHPTFTSQY (SEQ ID NO: 38), QAIRETVEL (SEQ ID NO: 39), TRATKMQVI (SEQ ID NO: 40), DALPGPCI (SEQ ID NO: 41), CEDVPSGKL (SEQ ID NO: 42), HERNGFTVL (SEQ ID NO: 43), PTFTSQYRIQGKL (SEQ ID NO: 44), QMWQARLTV (SEQ ID NO: 45), HELLVLVKKAQL (SEQ ID NO: 46), or DDYSNTHSTRYV (SEQ ID NO: 47), SLYNTVATL (SEQ ID NO: 48), GLCTLVAML (SEQ ID NO: 49), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 50), STNRQSGRQ (SEQ ID NO: 51), LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 52), FAEGFVRAL (SEQ ID NO: 53), LIVIGILIL (SEQ ID NO: 54), or ILHTPGCV (SEQ ID NO: 55), WYAQIQPHW (SEQ ID NO: 56), AFSGVSWTM (SEQ ID NO: 57), ILIGVVITW (SEQ ID NO: 58), MMIPTVVAF (SEQ ID NO: 59), PFPQSNAPI (SEQ ID NO: 60), LLLTLLATV (SEQ ID NO: 61), IVLEHGSCV (SEQ ID NO: 62), LLFKTENGV (SEQ ID NO: 63), PLNEAIMAV (SEQ ID NO: 64), NLVRLQSGV (SEQ ID NO: 65), LVISGLFPV (SEQ ID NO: 66), LLLVAHYAI (SEQ ID NO: 67), LALLAAFKV (SEQ ID NO: 68), VILAGPMPV (SEQ ID NO: 69), HVLGRLITV (SEQ ID NO: 70), o una variante de los mismos que comprende de 1 a 3 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus es un péptido derivado de citomegalovirus humano. En un modo de realización, el péptido derivado de virus tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70, En un modo de realización, el péptido derivado de virus tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 47,

En un modo de realización, el péptido derivado de virus tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más tiene una frecuencia relativa de un 10 % o más.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más es HLA-

A*0201, o HLA-A*1101, o HLA-A*2402, o HLA-A*340101, o HLA-C*0304, o HLA-C*0401, o HLA-C*0702.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0301, HLA-B*0702, HLA-B*0801, HLA-B*4402, HLA-C*0401, HLA-C*0501, HLA-C*0701 y HLA-C*0702,

- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-B*1301, HLA-B*1521, HLA-B*5601, HLA-B*5602, HLA-C*0102, HLA-C*0401, HLA-C*0403 y HLA-C*1502,

- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-C*0202, HLA-C*0304, HLA-C*0401 y HLA-C*0702, y

- para un individuo de origen del sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-B*1504, HLA-C*0102, HLA-C*0304, HLA-C*0702 y HLA-C*0801.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*0201,

- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402, HLA-B*1301, HLA-C*0102 y HLA-C*0401,

- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402 y HLA-C*0304, y

- para un individuo de origen del sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*2402.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T, una microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T, los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más y una microglobulina β_2, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T, una microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T, los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % o más y una microglobulina β_2, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % se selecciona del grupo que comprende HLA-B*4201, HLA-B*5901, HLA-B*6701 y HLA-B*7802.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende

(i) un péptido derivado de virus,

(ii) microglobulina β_2,

(iii) el alelo soluble de HLA-A A*0201 y

(iv) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende

(i) un péptido derivado de virus,

(ii) el alelo soluble de HLA-A A*0201 y

(iii) microglobulina β_2,

(iv) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana natural.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana y la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más es HLA-A*0201 humana.

En un modo de realización, los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal una microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una frecuencia relativa de aparición de menos de un 1 %, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una frecuencia relativa de aparición de menos de un 1 % y una microglobulina β_2, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se fusiona con la microglobulina β_2 por medio de un primer péptido conector.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se fusiona con el extremo N de la microglobulina β_2.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 se fusiona con el dominio extracelular α1 de una molécula de MHC de clase I por medio de un segundo péptido conector.

En un modo de realización, los dominios extracelulares α3 de una molécula de MHC de clase I se fusionan con una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro por medio de un tercer péptido conector.

En un modo de realización, el primer, segundo y tercer péptido conector es el mismo o diferente.

En un modo de realización, el primer péptido conector, el segundo péptido conector y el tercer péptido conector se seleccionan independientemente entre sí de las secuencias de aminoácidos GS (SEQ ID NO: 73), GGS (SEQ ID NO: 74), GSG (SEQ ID NO: 136), GGGS (SEQ ID NO: 75), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 76), GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 77), GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 78), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 79), GGGGS (SEQ ID NO: 80), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 81), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 83), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 84) y GCGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 139).

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

En un modo de realización de todos los aspectos, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En un modo de realización de todos los aspectos, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(iv) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(v) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108.

En un modo de realización,

- el primer péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139, y/o
- el segundo péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, y/o
- el tercer péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se caracteriza por que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende

SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se caracteriza por que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(iv) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(v) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la clase IgG o la clase IgE.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende al menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, P329, A330 y/o P331 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o de la subclase IgG2 humana con las mutaciones L234A y L235A, y/o las mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236, y/o contiene la mutación P329G.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A y/o P329G.

En un modo de realización, la región Fc del anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con la mutación S228P y/o L235E.

En un modo de realización, el primer y segundo polipéptido de la región Fc de anticuerpo se selecciona independientemente uno del otro del grupo que comprende SEQ ID NO: 87 a 101.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden independientemente uno del otro en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2 y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 o la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 o 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72, y

(iii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

(iii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

(iii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 104 a 106, y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP).

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprende una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que

comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 117,

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 118,

- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 137,

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 118,

- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 117,

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 118,

- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 137,
- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 118,
- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos cadenas polipeptídicas de SEQ ID NO: 117,
- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos cadenas polipeptídicas de SEQ ID NO: 137,
- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos cadenas polipeptídicas de SEQ ID NO: 117,
- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos cadenas polipeptídicas de SEQ ID NO: 137,
- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

En un modo realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

En un modo realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un

anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

En un modo realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

En un modo realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo de SEQ ID NO: 113.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 113.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de SEQ ID NO: 116 y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo de SEQ ID NO: 115.

En un modo de realización, el sitio de unión al MCSP comprende SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 115.

En un aspecto, la invención proporciona proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro que comprenden la especificidad de unión, es decir, HVR o dominios variables, de anticuerpos aislados que se unen al MCSP. En particular, la especificidad de unión del anticuerpo anti-MCSP, es decir, HVR o dominios variables, comprendida en las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se proporcionan en el presente documento se unen a un epítopo proximal a la membrana del MCSP humano. Como se analiza en Staub, E., *et al.* (FEBS Lett. 527 (2002) 114-118), la región proximal a la membrana del MCSP está compuesta por múltiples dominios repetidos novedosos, denominados dominios de repetición de CSPG.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un ácido nucleico que codifica la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento.

En un modo de realización, el ácido nucleico comprende de dos a cuatro casetes de expresión que comprenden genes estructurales que codifican polipéptidos con diferentes secuencias de aminoácidos.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una célula huésped que comprende el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento para producir una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento que comprende cultivar la célula huésped como se informa en el presente documento para que se produzca la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se recupera de las células o el medio de cultivo y, de este modo, se produce la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de una infección por un virus.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en atraer linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en la eliminación (supresión) de células cancerosas.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en la eliminación (supresión) de células infectadas por un virus.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer.

En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una infección vírica.

En un modo de realización, el medicamento es para atraer linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

En un modo de realización, el medicamento es para la eliminación (supresión) de células cancerosas.

En un modo de realización, el medicamento es para la eliminación (supresión) de células infectadas por un virus.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento. En un aspecto, el procedimiento comprende además administrar un agente terapéutico adicional al individuo.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento. En un aspecto, el procedimiento comprende además administrar un agente terapéutico adicional al individuo.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de atracción de linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para atraer linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de supresión de células cancerosas en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para suprimir/desintegrar células cancerosas.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de supresión de células infectadas por un virus en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para suprimir/desintegrar células infectadas por un virus.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento para la producción recombinante de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende i) un polipéptido de fusión de microglobulina β_2 y los dominios

extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I, ii) un par de cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, cada una comprendiendo una región bisagra de anticuerpo, y iii) al menos un par de un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo en una célula eucariota, que comprende las etapas de i) cultivar una célula eucariota que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, y ii) recuperar la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la célula o el medio de cultivo, en la que la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro comprende uno, dos o más polipéptidos de fusión unidos por disulfuro de microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I, en la que la unión de disulfuro se encuentra entre los residuos 11 y 227.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro comprende un polipéptido derivado de MHC o un polipéptido de fusión que comprende una molécula derivada de MHC.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro comprende dos polipéptidos derivados de MHC o dos polipéptidos de fusión que comprenden una molécula derivada de MHC.

En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se obtiene con una concentración de 1 mg/l o más en el medio de cultivo. En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se obtiene con una concentración de 4 mg/l o más en el medio de cultivo.

En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón embrionario humana, o una célula de ovario de hámster chino, o una célula de riñón de cría de hámster, o una célula de mieloma de ratón.

Los siguientes modos de realización se pueden combinar con cualquiera de los aspectos como se informa en el presente documento. Además, cualquier modo de realización como se informa en el presente documento se puede combinar con cualquier otro modo de realización o combinación de modos de realización como se informa en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

Breve descripción de las figuras

Figura 1 Esquema anotado de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro bivalente unido por disulfuro, como se informa en el presente documento; secuencia en dirección N a C terminal del polipéptido de fusión HLA-región Fc: 1-2-3-4-5-6-(3-6 enlace disulfuro)-7-8-9-12-13-14 (con II); secuencia en dirección N a C terminal del polipéptido de fusión HLA-cadena pesada: 1-2-3-4-5-6-(3-6 enlace disulfuro)-7-8-9-10-11-12-13-14 (con I); cadena ligera: a-b.

Figura 2 Polipéptidos ejemplares comprendidos en la proteína multifuncional como se informa en el presente documento: los polipéptidos de fusión se fusionaron de forma N terminal o bien con una cadena ligera de un anticuerpo o con una región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende el polipéptido.

Figura 3 Inmunoelectrotransferencia en un gel de poliacrilamida con SDS de sobrenadante de cultivo celular de células HEK 293 transfectadas con los plásmidos de expresión correspondientes. La tinción se realizó con anticuerpo policlonal de conejo contra la cadena ligera κ humana conjugado con peroxidasa y anticuerpo policlonal de conejo contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Carriles 1: péptido de dos brazos-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc; 2: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc + IgG-Fc; 3: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc; 4: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 5: microglobulina β_2 de dos brazos-HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 6: péptido de dos brazos-microglobulina β_2-HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 7: péptido de dos brazos-microglobulina β_2-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 8: péptido de dos brazos-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc-scFv; 9: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera); 10: marcador de peso molecular; 11: anticuerpo de IgG1 estándar de referencia.

Figura 4 Análisis de citometría de flujo para determinar el número de linfocitos T citolíticos específicos de CMV de diferentes donantes antes y después de la estimulación *in vitro* con péptido específico: Análisis de linfocitos de sangre periférica (PBL) derivados de 4 donantes humanos; tinción de anticuerpo anti-CD8 conjugado con marcador de FITC (BD, n.º de cat. 345772) combinado con TCR teñido con pentámero APC Pro5 (Prolmmune, n.º de cat. F008-4A-E) que reconoce MHC de clase I

(HLA-A*0201) cargado con péptido derivado de CMV (NLVPMVATV, SEQ ID NO: 01); círculo: linfocitos T $CD8^+$ específicos de CMV; A: donante 1; B: donante 3.

Figura 5 A: gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie: carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera), condiciones no reductoras; carril 3: péptido de un brazo-microglobulina β_2-HLA-A0201-IgG-Fc + proteína multifuncional de IgG de un brazo (cadena pesada y ligera), condiciones reductoras.

B: cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño; 1: formas de alto peso molecular (% de área 0,7); 2: proteína multifuncional monomérica (% de área 99,3).

C: molécula esquemática.

Figura 6 A: a) gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie después de HPLC con proteína A y SEC; condiciones no reductoras; carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG-Fc, carril 3: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera).

b): gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie después de HPLC con proteína A y SEC; condiciones reductoras; carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG-Fc, carril 3: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG de un solo brazo (cadena pesada y ligera).

B: a) cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño de péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG-Fc; 1: formas de alto peso molecular (% de área 1,9); 2: proteína multifuncional monomérica (% de área 98,1).

b) cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño de péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera); 1: formas de alto peso molecular (% de área 2,1); 2: proteína multifuncional monomérica (% de área 97,9)

C: moléculas esquemáticas 2: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG-Fc, 3: péptido-microglobulina β_2-HLA-A0201-HC + LC + IgG de un brazo.

Figura 7 Unión de diferentes proteínas multifuncionales MHC I en células diana MCSP+ (Colo38): se incubaron células Colo38 durante 5 min con Accutase (PAA, n.º de cat. L11-007) para obtener una suspensión de células sueltas. Se incubaron 2×10^5 células por vial con 1 µg/ml de proteína multifuncional MHC I en 100 µl de PBS/FCS al 2 % durante 45 min, a 4 °C. Después de la incubación, se lavaron las células con 1 ml de PBS frío/FCS al 2 % y se centrifugaron durante 7 min con 910 rpm. Se resuspendieron las células en 100 µl de PBS/FCS al 2 % con anticuerpo secundario (conjugado anticuerpo caprino contra IgG1 humana-PE, Jackson, n.º de cat. 109-116-088) (2 µg/ml) y se incubaron durante otros 45 min, a 4 °C. Se lavaron las células dos veces con 1 ml de PBS/FCS al 2 % y se midieron con un citómetro de flujo BD Canto II.

Figura 8 Ensayo de citotoxicidad: la proteína multifuncional de unión a antígeno como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células tumorales H460M2 a través de linfocitos T específicos del CMV humano. a) (6 h) células diana: linfocitos T efectores específicos del CMV 1:1,5; b) (6 h) células diana: linfocitos T efectores específicos del CMV 1:0,75; c) (6 h) células diana:linfocitos T efectores específicos del CMV 1:0,5; barra izquierda: proteína multifuncional como se informa en el presente documento; barra derecha MAB IGF-1R-afucosilado.

Figura 9 Ensayo de citotoxicidad: la proteína multifuncional de unión a antígeno como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células tumorales I24 3T3 a través de linfocitos T específicos del CMV humano; a) (9 h) células diana: linfocitos T efectores específicos del CMV 1:1,5; b) (9 h) células diana: linfocitos T efectores específicos del CMV 1:0,75; c) 9 h) células diana: linfocitos T efectores específicos del CMV 1:0,5; barra izquierda: proteína multifuncional como se informa en el presente documento; barra central: MAB IGF-1R-afu; barra derecha: anticuerpo antidigoxigenina.

Figura 10 Análisis por FACS de la unión del anticuerpo anti-IGF-1R y de las proteínas multifuncionales como se informa en el presente documento a la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H460M2; a) anticuerpo secundario solamente (caprino contra IgG(H+L) humana (Jackson Laboratories, n.º de cat. 109-116-088)); b) proteína multifuncional como se informa en el presente documento en el que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R que comprende solamente un par de dominios variables; c) anticuerpo anti-IGF-1R.

Figura 11 Eficacia y especificidad *in vitro* (ensayo de citotoxicidad) de diferentes proteínas multifuncionales como se informa en el presente documento; a) proteína multifuncional que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un péptido derivado de CMV; b) proteína multifuncional que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un péptido derivado de EBV (control); c) proteína multifuncional que comprende un anticuerpo anti-IGF1R bivalente y un péptido derivado de CMV; d) anticuerpo anti-IGF-1R (control); e) anticuerpo antidigoxigenina (control).

Figura 12 Eficacia y especificidad *in vitro* (valor de CE50) de una proteína multifuncional como se informa en el presente documento en la que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R completo determinado a diferentes proporciones de células dianas (T) con respecto a efectoras (E).

Figura 13 Lisis de células diana después de 6 horas de incubación con a) una proteína multifuncional que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un polipéptido de fusión que comprende un péptido derivado de CMV y b) un anticuerpo anti-IGF-1R a una proporción de células diana con respecto a efectoras de 1:1,5.

Figura 14 Evolución del índice celular normalizado para células Colo38 incubadas con proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP; concentración de proteína multifuncional de 1 µg/ml (MHCI-0008 (1), MHCI-0010 (2), MHCI-0030 (3), MHCI-0031 (4)), proporción de células efectoras con respecto a diana de 10:1; PBMC del donante 3 (200.000 células, el donante 3 es positivo para el CMV pero negativo para el EBV) y línea celular tumoral de melanoma Colo38 (20.000 células) y por 96 pocillos, los datos son triplicados.

Figura 15 A: evolución del índice celular normalizado para células Colo38 incubadas con proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP; concentración de proteína multifuncional de 1 µg/ml (MHCI-0008 (1), MHCI-0010 (2), PBMC solamente (3)), proporción de células efectoras con respecto a diana de 10:1; PBMC del donante 3 (200.000 células, el donante 3 es positivo para el CMV pero negativo para el EBV) y línea celular tumoral de melanoma Colo38 (20.000 células) y por 96 pocillos, los datos son triplicados.

B: evolución del índice celular normalizado para células WM266 incubadas con proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP; concentración de proteína multifuncional de 1 µg/ml (MHCI-0008 (1), MHCI-0010 (2), MHCI-0030 (3), MHCI-0031 (4), células diana solas (5), células diana + linfocitos T (6)), proporción de células efectoras con respecto a diana de 10:1; PBMC del donante 3 (200.000 células, el donante 3 es positivo para el CMV pero negativo para el EBV) y línea celular tumoral de melanoma MW266 (20.000 células) y por 96 pocillos, los datos son triplicados.

Figura 16 Lisis de células diana después de 42 horas de incubación con proteína multifuncional en presencia de PBMC no estimuladas por las proteínas multifuncionales MHCI-0008 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, 1), MHCI-0010 (monovalentes, control cargadas con péptido de EBV, 2), MHC-0026 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, control de no unión, 3), MHCI-0030 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 4) y MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 5).

Figura 17 Liberación de LDH después de 48 horas de incubación con proteína multifuncional efectuada en presencia de PBMC no estimuladas por las proteínas multifuncionales MHCI-0008 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, 1), MHCI-0010 (monovalentes, control cargadas con péptido de EBV, 2), MHC-0026 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, control de no unión, 3), MHCI-0030 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 4) y MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 5).

Figura 18 A: lisis de células Colo38 después de 10 horas de incubación con proteína multifuncional en presencia de PBMC estimuladas por las proteínas multifuncionales MHCI-0008 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, 1), MHCI-0010 (monovalentes, control cargadas con péptido de EBV, 2), MHC-0026 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, control de no unión, 3), MHCI-0030 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 4) y MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 5) a una concentración de 1 µg/ml.

B: lisis de células WM266 después de 10 horas de incubación con proteína multifuncional en presencia de PBMC estimuladas por las proteínas multifuncionales MHCI-0008 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, 1), MHCI-0010 (monovalentes, control cargadas con péptido de EBV, 2), MHC-0026 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, control de no unión, 3), MHCI-0030 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 4) y MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, 5) a una concentración de 1 µg/ml.

Figura 19 Cromatograma de exclusión por tamaño analítico después de cromatografía de afinidad con proteína A pero antes de cromatografía de exclusión por tamaño preparativa de una proteína multifuncional estabilizada sin disulfuro (A) y una proteína multifuncional estabilizada con disulfuro (B).

Figura 20 Lisis de células Colo38 en presencia de PBMC estimuladas por las proteínas multifuncionales MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, no unidas por disulfuro, 1) y MHCI-0054 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas, versión unida por disulfuro de MHCI-0031, 2) a una concentración de 1 µg/ml.

Figura 21 Estabilidad térmica de las IgG de longitud completa naturales (triángulos), proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro ejemplares como se informa en el presente documento (rombos), proteínas multifuncionales multivalentes sin estabilización con enlaces disulfuro (asterisco).

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 01 a 47 Péptidos derivados del citomegalovirus humano.

SEQ ID NO: 48 Péptido derivado del virus de la inmunodeficiencia humana.

SEQ ID NO: 49 Péptido derivado del herpesvirus humano 4.

SEQ ID NO: 50 Péptido derivado del virus de la gripe A.

SEQ ID NO: 51 Péptido derivado del virus de la hepatitis B.

SEQ ID NO: 52 Péptido derivado del virus linfótropo de linfocitos T humano de tipo 1.

SEQ ID NO: 53 Péptido derivado del homólogo del oncogén del virus del sarcoma V-jun 17 (JUN).

SEQ ID NO: 54 Péptido derivado del adenovirus humano de tipo 3.

SEQ ID NO: 55 Péptido derivado del virus de la hepatitis C.

SEQ ID NO: 56 a 70 Péptidos derivados del virus del dengue.

SEQ ID NO: 71 Secuencia de aminoácidos de microglobulina β_2 humana.

SEQ ID NO: 72 Secuencia de aminoácidos de la cadena α1-α3 de HLA-A*0201 humana.

SEQ ID NO: 73-84 Secuencias de aminoácidos del péptido conector.

SEQ ID NO: 85 Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 86 Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 87 Secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 88 Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 89 Secuencia de aminoácidos de los mutantes T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 90 Secuencia de aminoácidos del mutante T366W de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 91 Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 92 Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, T366W de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 93 Secuencia de aminoácidos del mutante P329G de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 94 Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G de la región Fc de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 95	Secuencia de aminoácidos de los mutantes P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 96	Secuencia de aminoácidos de los mutantes P329G, T366W de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 97	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 98	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366W de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 99	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 100	Secuencia de aminoácidos de los mutantes S228P, L235E de la región Fc de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 101	Secuencia de aminoácidos de los mutantes S228P, L235E, P329G de la región Fc de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 102	Secuencia de aminoácidos de los mutantes S228P, L235E, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 103	Secuencia de aminoácidos de los mutantes S228P, L235E, P329G, T366W de la región Fc de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 104	HVR-L1
SEQ ID NO: 105	HVR-L2
SEQ ID NO: 106	HVR-L3
SEQ ID NO: 107	HVR-L1
SEQ ID NO: 108	HVR-H1
SEQ ID NO: 109	HVR-H2
SEQ ID NO: 110	HVR-H3
SEQ ID NO: 111	HVR-H1
SEQ ID NO: 112	HVR-H2
SEQ ID NO: 113	VL
SEQ ID NO: 114	VH
SEQ ID NO: 115	VL
SEQ ID NO: 116	VH
SEQ ID NO: 117	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-MHC-I-VH (MCSP).
SEQ ID NO: 118	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366W de la región Fc de IgG1-VH(MCSP).
SEQ ID NO: 119	Secuencia de aminoácidos de VL(MCSP)-CL.
SEQ ID NO: 120	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-IGF-1R humanizado (kappa).
SEQ ID NO: 121	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1).

SEQ ID NO: 122	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de botón).
SEQ ID NO: 123	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de ojal).
SEQ ID NO: 124	Región bisagra de mutante de la región Fc de IgG1 humana y mutantes L234A, L235A y variante de botón.
SEQ ID NO: 125	Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado.
SEQ ID NO: 126	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-MCSP murino (kappa).
SEQ ID NO: 127	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-MCSP humanizado (kappa).
SEQ ID NO: 128	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1).
SEQ ID NO: 129	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1).
SEQ ID NO: 130	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de botón).
SEQ ID NO: 131	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de botón).
SEQ ID NO: 132	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de ojal).
SEQ ID NO: 133	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de ojal).
SEQ ID NO: 134	Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-MCSP murino.
SEQ ID NO: 135	Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-MCSP humanizado.
SEQ ID NO: 136	Péptido conector 13.
SEQ ID NO: 137	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-MHC-I-VH (MCSP) estabilizado con disulfuro.
SEQ ID NO: 138	Secuencia de aminoácidos de MCSP humano.
SEQ ID NO: 139	Conector para proteínas multifuncionales unidas por disulfuro.
SEQ ID NO: 140	Secuencia de aminoácidos de la cadena α1-α3 de HLA-A*0201 humana modificada para proteínas multifuncionales unidas por disulfuro.
SEQ ID NO: 141	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-VH (MCSP).
SEQ ID NO: 142	Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366W de la región Fc de IgG1-VH (MCSP).

I. DEFINICIONES

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad se

puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

El término "aminoácido" como se usa dentro de esta solicitud indica el grupo de carboxi α-aminoácidos, que directamente o en forma de un precursor se pueden codificar por un ácido nucleico. Los aminoácidos individuales se codifican por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de bases. Cada aminoácido se codifica por al menos un codón. Esto se conoce como "degeneración del código genético". El término "aminoácido" como se usa dentro de esta solicitud indica los carboxi α-aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Los términos "anticuerpo antidiana" y "un anticuerpo que se une a una diana" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a una diana con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse contra la diana. En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a la diana tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); anticuerpos de dominio único; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "sitio de unión a antígeno" indica un resto proteináceo que se puede unir específicamente a una diana. Los sitios de unión a antígeno ejemplares son péptidos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de dominio o dominios variables de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, anticuerpos de camello o tiburón). El sitio de unión a antígeno puede ser un sitio de unión a antígeno natural o un sitio de unión a antígeno genomanipulado. Los sitios de unión a antígeno genomanipulados ejemplares son DARPIN, anticuerpos con intercambio de dominios o fragmentos de anticuerpo con intercambio de dominios, y anticuerpos de dominio variable dual.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir, adicionalmente, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

El término "molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de" indica que la molécula de MHC de clase I respectiva tiene una frecuencia de aparición en una población específica de seres humanos o dentro de todos los seres humanos de la frecuencia relativa dada. Es decir, una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más se puede hallar en un 10 % o más de todos los seres humanos de una población específica, tal como, por ejemplo, en un 27,2 % de todos los seres humanos de origen europeo.

La "conjugación" de una proteína multifuncional con su ligando de conjugación se puede realizar mediante diferentes procedimientos, tales como unión química, o unión por medio de un par de unión específico, o por medio de fusión genética. El término "ligando de conjugación" indica, por ejemplo, polipéptidos, marcadores detectables, miembros de pares de unión específicos. En un modo de realización, la conjugación de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro con su ligando de conjugación se realiza mediante unión química por medio de grupos N terminales y/o ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólicos de la secuencia de aminoácidos de las partes de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, y/o grupos alditol de la estructura glucídica de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro. En un modo de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se conjuga con su ligando de conjugación por medio de un par de unión específico.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes

intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de micromolécula o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos; y los diversos antineoplásicos o antitumorales.

Los cromógenos (grupos y colorantes fluorescentes o luminiscentes), las enzimas, los grupos o partículas metálicas activos en RMN, los haptenos, por ejemplo, la digoxigenina, son ejemplos de "marcadores detectables". El marcador detectable también puede ser un grupo de reticulación fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o azirina. Los quelatos metálicos que se pueden detectar mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales adecuados, dándose particular preferencia a quelatos de rutenio, por ejemplo, un quelato de rutenio $(bispiridilo)_3^{2+}$. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138. Para la detección directa, el grupo marcador se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, tales como colorantes, grupos marcadores luminiscentes tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o colorantes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos marcadores son complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, las usadas para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo de donante con enzima clonada, por ejemplo, el documento EP-A-0 061 888) y radioisótopos.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos de transcripción y/o traducción y secreción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula se puede determinar basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés se puede cuantificar mediante RT-PCR o mediante hibridación Northern (véase Sambrook, *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico se pueden cuantificar mediante diversos procedimientos, por ejemplo, mediante ELISA, mediante el ensayo de la actividad biológica del polipéptido, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como inmunoelectrotransferencia o radioinmunoensayo, usando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (véase Sambrook, *et al*., (1989), *supra*).

Un "casete de expresión" indica una construcción que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como promotor y sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

El término "mecanismo de expresión" indica la suma de las enzimas, cofactores, etc., de una célula que participa en las etapas que comienzan con la etapa de transcripción de un ácido nucleico o gen (es decir, también denominado "mecanismo de expresión génica") para la modificación postraduccional del polipéptido codificado por el ácido nucleico. El mecanismo de expresión, por ejemplo, comprende las etapas de transcripción de ADN en pre-ARNm, corte y empalme de pre-ARNm en ARNm maduro, traducción en un polipéptido del ARNm y modificación postraduccional del polipéptido.

Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) comprendido(s) en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmidos procariotas, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariótico, y uno o más casetes de expresión para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que se "une funcionalmente al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor mínimo se unen funcionalmente si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

El término "región Fc" indica la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La región Fc es una molécula dimérica que comprende dos polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo unidos por disulfuro. Se puede generar una región Fc mediante digestión con papaína, o digestión con IdeS o digestión con tripsina de un anticuerpo intacto (de longitud completa) o se puede producir de forma recombinante.

La región Fc obtenible a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina de longitud completa comprende al menos los residuos 226 (Cys) en el extremo C de la cadena pesada de longitud completa y, por tanto, comprende una parte de

la región bisagra y dos o tres dominios constantes, es decir, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4 adicional/extra en el caso de anticuerpos de las clases IgE e IgM. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat, E.A., *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

La formación de la región Fc dimérica que comprende dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada del anticuerpo idénticos o no idénticos está mediada por la dimerización no covalente de los dominios CH3 comprendidos (para los residuos aminoacídicos implicados véase, por ejemplo, Dall'Acqua, Biochem. 37 (1998) 9266-9273). La región Fc se estabiliza covalentemente mediante la formación de enlaces disulfuro en la región bisagra (véase, por ejemplo, Huber *et al*., Nature 264 (1976) 415-420; Thies, *et al*., J. Mol. Biol. 293 (1999) 67-79).

Se conoce de los documentos US 5.648.260 y US 5.624.821 que la modificación de residuos aminoacídicos definidos en la región Fc da como resultado efectos fenotípicos.

La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento puede comprender en un modo de realización como polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo una región Fc humana o una región Fc derivada de origen humano. En otro modo de realización, la región Fc es bien una región Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 o una región Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal manera que no se puede detectar la unión al receptor Fcγ (por ejemplo, FcRIIIa) y/o la unión a C1q. En un modo de realización, la región Fc es una región Fc humana y especialmente bien de la subclase IgG4 humana o una región Fc mutada de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, la región Fc es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A y P329G. Mientras que la IgG4 muestra una unión al receptor Fcγ reducida (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidratos de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 o/y His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también unión reducida al receptor Fcγ (Shields, R.F., *et al*., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., *et al*., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., *et al*., Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En un modo de realización, una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento se refiere a la unión al receptor Fcγ de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235, P329 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En un modo de realización, las mutaciones son S228P, L234A, L235A, L235E, PVA236 (PVA236 indica que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en un código de aminoácidos de una letra) desde la posición de aminoácidos 233 a 236 de la IgG1 o EFLG de la IgG4 se reemplaza por PVA) y/o P329G. En un modo de realización, las mutaciones son S228P y P329G de la IgG4, y L234A, L235A y P329G de la IgG1. La región Fc de un anticuerpo participa directamente en ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que no une el receptor Fcγ y/o el factor del complemento C1q no provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Una cadena polipeptídica de una región Fc humana natural del isotipo IgG1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con mutaciones T366S, L368A e

Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 89).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 90).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 93).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 95).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 96).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 97).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 98).

Una cadena polipeptídica de una región Fc humana natural del isotipo IgG4 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 99).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P y L235E tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 100).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 101).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E, P329G y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 102).

Una cadena polipeptídica de una variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E, P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 103).

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

El término "célula" incluye tanto células procariotas, que se usan para la propagación de plásmidos, como células eucariotas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico. En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero se selecciona del grupo de células de mamífero que comprende células CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DG44), células BHK, células NS0, células Sp2/0, células HEK 293, células HEK 293 EBNA, células PER.C6® y células COS.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un "inmunoconjugado" indica una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento conjugada con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero no limitado a, un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro "aislada" es una que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se purifica hasta más de un 95 % o un 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El término "MCSP", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier MCSP (proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina) natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba MCSP sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de MCSP que resulte del procesado en la célula. El término también engloba variantes naturales de MCSP, por ejemplo, variantes de ayuste o variantes alélicas. MCSP también se conoce como proteoglucano sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteoglucano sulfato de condroitina NG2, antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) y proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina. La secuencia de aminoácidos de un MCSP humano ejemplar se muestra en SEQ ID NO: 1. Véase también Pluschke, G., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 9710-9715, Staub, E., *et al*., FEBS Lett. 527 (2002) 114-118, y número de acceso de GenBank: NP_001888.

El término "un dominio presentador de antígeno" indica exactamente uno, es decir, un único, dominio presentador de antígeno como se define y excluye la presencia de otro, es decir, un segundo, dominio presentador de antígeno definido. El término "uno" indica "exactamente uno" o "un único".

El término "dos dominios presentadores de antígeno" indica la presencia de exactamente dos dominios presentadores de antígeno como se define y excluye la presencia de solamente un único, es decir, uno, dominio presentador de antígeno.

"Unido funcionalmente" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador se unen funcionalmente a una secuencia codificante, si este actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia unida. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que se "unen funcionalmente" son contiguas y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas tales como un líder secretor y un polipéptido, contiguas y en marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor unido funcionalmente se localiza en general en dirección 5′ de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo con ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador se une funcionalmente a una secuencia codificante si el potenciador incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores unidos funcionalmente se pueden localizar en dirección 5′, dentro o en dirección 3′ de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se une funcionalmente a una secuencia codificante si se localiza en el extremo en dirección 3’ de la secuencia codificante de modo que la transcripción avance a través de la secuencia codificante hacia la secuencia de poliadenilación. Un codón finalizador de la traducción se une funcionalmente a una secuencia de ácido nucleico exónico si se localiza en el extremo en dirección 3’ (extremo 3') de la secuencia codificante de modo que la traducción avance a través de la secuencia codificante hasta el codón finalizador y se termine allí. La unión se logra mediante procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de

PCR y/o mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "prospecto del envase" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término "conector peptídico" indica secuencias de aminoácidos de origen natural y/o sintético. Consisten en una cadena de aminoácidos lineal en la que los 20 aminoácidos naturales son los componentes básicos monoméricos. El conector peptídico tiene una longitud de desde 1 a 50 aminoácidos, en un modo de realización entre 1 y 28 aminoácidos, en otro modo de realización entre 2 y 25 aminoácidos. El conector peptídico puede contener secuencias de aminoácidos repetitivas o secuencias de polipéptidos naturales. El conector tiene la función de garantizar que polipéptidos conjugados entre sí puedan realizar su actividad biológica permitiendo que los polipéptidos se plieguen correctamente y se presenten apropiadamente. En un modo de realización, el conector peptídico es rico en residuos de glicina, glutamina y/o serina. Estos residuos se disponen, por ejemplo, en pequeñas unidades repetitivas de hasta cinco aminoácidos, tales como GS (SEQ ID NO: 73), GGS (SEQ ID NO: 74), GGGS (SEQ ID NO: 75) y GGGGS (SEQ ID NO: 80). Esta pequeña unidad repetitiva se puede repetir de una a cinco veces. En los extremos amínico y/o carboxílico de la unidad multimérica se pueden añadir hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales. Otros conectores peptídicos sintéticos se componen de un único aminoácido, que se repite entre 10 a 20 veces y puede comprender en el extremo amínico y/o carboxílico hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales. Todos los conectores peptídicos se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico y, por lo tanto, se pueden expresarde forma recombinante. Como los conectores son en sí mismos péptidos, el polipéptido conectado por el conector se conecta al conector por medio de un enlace peptídico que se forma entre dos aminoácidos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que es atóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 25 residuos aminoacídicos se pueden denominar "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos aminoacídicos se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos glucídicos, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos se pueden añadir por la célula en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de su esqueleto de aminoácidos o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones tales como grupos glucídicos, en general, no se especifican, pero, no obstante, pueden estar presentes.

Un "gen estructural" indica la región de un gen sin una secuencia señal, es decir, la región codificante.

El término "péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T" indica un péptido que se presenta en el surco de unión a péptido de una proteína multifuncional MHC de clase I y que se reconoce por los linfocitos T efectores o de memoria circulantes. El reconocimiento del péptido da como resultado una respuesta inmunitaria que efectúa la supresión de la célula que presenta dicho péptido-proteína multifuncional MHC de clase I.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como “tratar” o “que trata”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o atenuación de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J.

Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al*., Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

A. Proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro ejemplar

En el presente documento se informa de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende, como primera parte, una parte derivada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segunda parte, un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I.

Con la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento, los linfocitos T citotóxicos circulantes específicos de virus existentes (linfocitos T de memoria y/o linfocitos T efectores) de un individuo se pueden dirigir a células que expresan el antígeno diana, al que se une específicamente la parte derivada de anticuerpo de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, revistiendo estas células con complejos multifuncionales de MHC de clase I que imitan una infección vírica aguda.

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento, que comprende como primera parte un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I y como segunda parte una molécula unida por disulfuro derivada de anticuerpo, se puede usar para dirigir los linfocitos T citotóxicos específicos de virus existentes de un individuo a células que expresan un antígeno diana que imitan una infección vírica aguda y, de este modo, se puede iniciar la eliminación (supresión) de las células que expresan el antígeno diana.

Se ha descubierto que, a diferencia de las proteínas multifuncionales que comprenden MHC de clase I no unida por disulfuro, en las que como máximo puede estar presente una única unidad de la MHC de clase I en combinación con una región bisagra de anticuerpo para permitir la producción recombinante, en las proteínas multifuncionales que comprenden MHC de clase I unida por disulfuro pueden estar presentes una, dos o más unidades de MHC de clase I unidas por disulfuro sin obstaculizar la producción recombinante en combinación con una región bisagra de anticuerpo en la proteína multifuncional multivalente.

Usando una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento que comprende un, es decir, un único, dominio presentador de antígeno, algunos modos de acción de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento que comprende dos o más dominios presentadores de antígeno ya no son posibles, tal como la reticulación de receptores de linfocitos T. Adicionalmente, las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento que comprenden un dominio presentador de antígeno se pueden producir con rendimientos mejorados y tienen una estabilidad térmica mejorada. Además, sin estar vinculado por esta teoría, las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento que comprenden un dominio presentador de antígeno son más específicas con respecto a la activación de linfocitos T (véase el ejemplo 15).

En determinados modos de realización, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende uno, dos o más dominios presentadores de antígeno, comprendiendo cada uno (i) un péptido derivado de virus, (ii) el alelo soluble de HLA-A A*0201y (iii) microglobulina beta-2, en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En determinados modos de realización, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende uno, dos o más dominios presentadores de antígeno, comprendiendo cada uno (i) un péptido derivado de virus, (ii) el alelo soluble de HLA-A A*0201y (iii) microglobulina beta-2, en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

Las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer o las infecciones víricas.

En un aspecto, la invención proporciona una proteína multifuncional que se une (i) a un antígeno de superficie celular y (ii) a linfocitos T citotóxicos.

Las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento aprovechan una respuesta inmunitaria antivírica altamente eficaz natural para eliminar/suprimir/desintegrar células

diana, por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus. La eliminación de células se consigue usando los propios linfocitos T circulantes muy poderosos de un individuo que no necesitan ninguna coestimulación para su activación. Además, se necesita un pequeño número de moléculas terapéuticas en la superficie celular para este mecanismo de acción (véase, por ejemplo, Mottez *et al.*, J. Exp. Med. 181 (1995) 493-502).

Durante el tratamiento, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro puede desencadenar la respuesta inmunitaria antivírica del individuo similar a una inmunización. De este modo, múltiples tratamientos/aplicaciones pueden potenciar la eficacia del tratamiento. Por tanto, se puede usar una inmunización como tratamiento previo para potenciar la eficacia.

También se puede usar un alotipo cuya frecuencia dentro de la población sea muy baja, como en un modo de realización, por debajo de un 1 %. El uso de dicho alotipo puede hacer obsoleta la etapa de inmunización ya que el sistema inmunitario del individuo reconocerá que el alotipo es extraño y se iniciará una respuesta inmunitaria.

El sitio de unión a antígeno específico debe ser altamente específico de la célula o del antígeno para limitar la toxicidad y los efectos secundarios.

Por tanto, usando una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento

(i) solamente se activa una población de linfocitos T altamente específicos (células efectoras/de memoria positivas para CD8 específicas para un único péptido derivado de virus mostrado en el complejo de proteína MHC-I de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro), todas las demás células $CD3^+$ no se ven afectadas (linfocitos T $CD4^+$: TH1, TH2, TH17, linfocitos T reguladores);

(ii) se imita la respuesta natural del sistema inmunitario del individuo (supresión normal de las células infectadas por el virus); y

(iii) la respuesta a la aplicación/tratamiento de/con la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro será baja al principio pero se puede reforzar durante el tratamiento (los linfocitos T específicos se activarán y se expandirán en número), con lo que inicialmente se pueden reducir las reacciones a la infusión y la liberación inicial de citocinas.

En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de estimulación de linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 mediante la aplicación de un péptido derivado de virus seleccionado, por ejemplo, un péptido derivado de citomegalovirus humano (huCMV). En un modo de realización preferente, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.

Se ha demostrado que los linfocitos T específicos de péptido de CMV activados median la supresión eficaz de células tumorales *in vitro* (células tumorales cargadas con el péptido derivado de CMV *in vitro*).

Las células infectadas por virus presentan un complejo de péptidos derivados de virus con proteínas de MHC de clase I en su superficie celular. Estos se reconocen por linfocitos T $CD8^+$ específicos que suprimen/reducen las células presentadoras de péptido derivado de virus. Los linfocitos T $CD8^+$ citolíticos (citotóxicos) (CTL) reconocen los péptidos en las proteínas de MHC de clase I por su receptor de linfocitos T específico. Los CTL desencadenan la supresión de células infectadas por virus sin necesidad de una señal de coestimulación.

Se pueden usar células efectoras, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o linfocitos T $CD8^+$ separados por FACS, que se pueden preestimular con el péptido derivado de CMV como comprende el polipéptido de fusión como se informa en el presente documento.

El alotipo HLA de un individuo que se va a tratar se tiene que reconocer.

De acuerdo con NCBI, los alotipos HLA con una frecuencia de un 10 % o más se distribuyen como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla.

Alotipo HLA **HLA-**	**Frecuencia australiana** **[%]**	**Frecuencia europea** **[%]**	**Frecuencia de América del Norte [%]**	**Frecuencia del sudeste asiático** **[%]**
A*01:01		16,4		
A*02:01	12,7	27,2	19,7	
A*02:04				
A*03:01		14,1		

A*11:01	13,5			20,4
A*24:02	25,9		37,7	29,9
A*31:01:02				
A*34:01:01	40,1			
B*07:02		13,9		
B*08:01		11,8		
B*13:01	23,8			
B*15:04				11,7
B*15:21	10,6			
B*44:02		10,6		
B*56:01	16,1			
B*56:02	10,3			
C*01:02	24,6			13,3
C*02:02			12,7	
C*03:03				
C*03:04			20,4	17,3
C*04:01	26,0	10,1	15,0	
C*04:03	13,9			
C*05:01		10,6		
C*06:02				
C*07:01		17,0		
C*07:02		15,9	10,2	18,9
C*08:01				12,8
C*15:02	16,5			

Por tanto, un aspecto como se informa en el presente documento es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de unión a antígeno, caracterizada por que comprende

- uno, dos o más dominios presentadores de antígeno,
- una región Fc de anticuerpo, y
- uno o más sitios de unión a antígeno,

en la que los dominios presentadores de antígeno comprenden independientemente el uno del otro en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 %

o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el sitio de unión a antígeno se une a un antígeno de superficie de células cancerosas,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, un dominio presentador de antígeno que comprende en la dirección N a C terminal una microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % comprende además en su extremo N un péptido que se une al surco de unión de MHC-péptido, en el que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro. En un modo de realización, el péptido es un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T.

En un modo de realización, el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido derivado de virus. En un modo de realización, el virus se selecciona de adenovirus, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, herpesvirus humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus humano de tipo 16, papilomavirus humano de tipo 18, papilomavirus humano de tipo 31, papilomavirus humano de tipo 33, papilomavirus humano de tipo 35, papilomavirus humano de tipo 39, papilomavirus humano de tipo 45, papilomavirus humano de tipo 51, papilomavirus humano de tipo 52, papilomavirus humano de tipo 56, papilomavirus humano de tipo 58, papilomavirus humano de tipo 59, papilomavirus humano de tipo 68, papilomavirus humano de tipo 73, papilomavirus humano de tipo 82, virus linfótropo de linfocitos T humano de tipo I, virus de la gripe A humano, virus de la gripe B humano o virus de la variolovacuna.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se selecciona de NLVPMVATV (SEQ ID NO: 01), SLYNTVATL (SEQ ID NO: 48), GLCTLVAML (SEQ ID NO: 49), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 50), STNRQSGRQ (SEQ ID NO: 51), LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 52), FAEGFVRAL (SEQ ID NO: 53), LIVIGILIL (SEQ ID NO: 54) o ILHTPGCV (SEQ ID NO: 55).

En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana. En un modo de realización, la microglobulina β_2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más es HLA-A*0201 humano. En un modo de realización, los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se fusiona con la microglobulina β_2 por medio de un primer péptido conector.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 se fusiona con el dominio extracelular α1 de una molécula de MHC de clase I por medio de un segundo péptido conector.

En un modo de realización, el dominio extracelular α3 de una molécula de MHC de clase I se fusiona con el polipéptido (bien unido por disulfuro o no unido por disulfuro) por medio de un tercer péptido conector.

En un modo de realización, el primer, segundo y tercer péptido conector es el mismo o diferente.

En un modo de realización, el primer péptido conector, el segundo péptido conector y el tercer péptido conector se seleccionan independientemente entre sí de las secuencias de aminoácidos GS (SEQ ID NO: 73), GGS (SEQ ID NO: 74), GGGS (SEQ ID NO: 75), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 76), GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 77), GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 78), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 79), GGGGS (SEQ ID NO: 80), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 81), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 83), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 84) y GCGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 139).

En un modo de realización, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

En un modo de realización, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En un modo de realización, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la clase IgG o la clase IgE.

En un modo de realización, la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de origen humano. En un modo de realización, el dominio CH2 y el CH3 de origen humano es de un anticuerpo humano de la clase IgG o IgE. En un modo de realización, el dominio CH2 y el dominio CH3 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4. En un modo de realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende al menos una mutación de E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, P329, A330 y/o P331 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG2 humana con las mutaciones L234A y L235A, y/o las mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236, y/o contiene la mutación P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A, y/o P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con las mutaciones S228P y/o L235E.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

En un modo de realización, el primer y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 101.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro o el segundo polipéptido unido por disulfuro consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 98.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

En un modo de realización, los polipéptidos unidos por disulfuro se unen por dos, o tres, o cuatro enlaces disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno se caracteriza por que, en la dirección N a C terminal, comprende

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136,

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

En un modo de realización, el dominio presentador de antígeno se caracteriza por que, en la dirección N a C terminal, comprende

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136,

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición

11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

De la figura 10 se puede observar que una proteína multifuncional mantiene las propiedades de unión del sitio de unión a antígeno con el que se combina (figura 10 b) y c)).

En las figuras 11 y 13, se muestra la eficacia y especificidad *in vitro* de una proteína multifuncional.

El ensayo de citotoxicidad se realizó en presencia de linfocitos T $CD8^+$ específicos de CMV. Se puede observar que una proteína multifuncional que comprende un péptido de virus derivado de CMV induce la lisis/supresión/desintegración/eliminación de las células diana (véase la figura 11 a) para un anticuerpo monovalente, figura 11 b) para un anticuerpo bivalente). Se puede observar además que la lisis de las células diana es altamente específica ya que la incubación con la proteína multifuncional que comprende un péptido vírico derivado del EBV (figura 11 b)) y anticuerpos de control (figura 11 d) y e)) no dan como resultado una lisis celular extensa (la lisis espontánea es de aproximadamente un 3,5 %).

En la figura 13 se muestra la lisis de la línea celular H460M2 de adenocarcinoma de pulmón positivo para IGF-IR.

El valor de CE_{50} para una proteína multifuncional que comprende un péptido derivado de CMV y un anticuerpo bivalente es de aproximadamente 10 ng/ml, que corresponde a aproximadamente 50 pM. El valor de CE_{50} determinado es independiente de la proporción de células dianas con respecto a células efectoras (véase la figura 12; proporción de células diana con respecto a células efectoras de 1:3 a 1:1, que corresponde a una proporción eficaz de 1:0,44 a 1:0,14 (un 76 % de las células efectoras son positivas para CD8 y un 19 % son específicas de CMV)).

1. Afinidad

En determinados modos de realización, una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se proporciona en el presente documento comprende un sitio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo, por ejemplo, un par de dominios variables de anticuerpo o un anticuerpo de dominio único. En determinados modos de realización, el sitio de unión a antígeno tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M) con respecto a su antígeno.

En un modo de realización, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial.

Por ejemplo, esto se puede hacer usando un instrumento BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 ºC con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 ºC a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (kaso) y las tasas de disociación (kdis) se calculan usando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción kdis/kaso. Véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881.

2. Expresión

La expresión de diferentes proteínas multifuncionales bivalentes no unidas por disulfuro (diferentes conectores, diferentes combinaciones de HLA y microglobulina β_2) en células HEK 293 y CHO dio lugar a una acumulación de la proteína multifuncional bivalente no unida por disulfuro, si acaso era detectable, dentro del retículo endoplasmático, es decir, el aislamiento y la secreción de la proteína multifuncional bivalente no unida por disulfuro estaba fuertemente alterado, si acaso era detectable.

No se pudo detectar ninguna secreción de una proteína multifuncional no unida por disulfuro en el medio de cultivo cuando la proteína multifunonal estaba destinada a comprender uno de los polipéptidos como se indica en las siguientes tablas.

Tabla.

péptido señal	péptido derivado de CMV	microglobulina β2	cadenas α1-α2-α3	región Fc de IgG	scFv

péptido señal	péptido derivado de CMV	microglobulina β2	cadenas α1-α2-α3	cadena pesada de anticuerpo	

Tabla.

péptido señal	péptido derivado de CMV	G4S(G3S)2-conector	microglobulina β2	(G4S)3-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)2-conector	cadena ligera de anticuerpo	cadena ligera de anticuerpo
péptido señal	microglobulina β2	(G4S)3-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)2-conector	cadena ligera de anticuerpo			
péptido señal	péptido derivado de CMV	(G3S)2GG-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	microglobulina β2	(G4S)2-conector	cadena ligera de anticuerpo	cadena ligera de anticuerpo
péptido señal	péptido derivado de CMV	GGPGGGSGGG-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	microglobulina β2	(G4S)2-conector	cadena ligera de anticuerpo	
péptido señal	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	microglobulina β2	(G4S)2-conector	cadena ligera de anticuerpo			
péptido señal	péptido derivado de CMV	(G3S)2GG-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	cadena ligera de anticuerpo			
péptido señal	péptido derivado de CMV	GGPGGGSGGG-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	cadena ligera de anticuerpo			
péptido señal	péptido derivado de CMV	(G3S)2GG-conector	cadenas α1-α2-α3	(G4S)3-conector	microglobulina β2	(G4S)2-conector	cadena pesada de anticuerpo	

Se ha descubierto que no es posible en células eucariotas la expresión, y especialmente la secreción, de proteínas multifuncionales que comprenden dos dominios presentadores de antígeno no unidos por disfulfuro formados por un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I, y al menos un dominio variable y un dominio constante de un anticuerpo.

Además, se ha descubierto que no es posible en células eucariotas la expresión, y especialmente la secreción, de proteínas multifuncionales que comprenden dos dominios presentadores de antígeno no unidos por disfulfuro formados por un péptido derivado de virus unido a una proteína multifuncional de proteína MHC de clase I, al menos un dominio variable y una región bisagra de anticuerpo.

Sin embargo, se ha descubierto que es posible en células eucariotas la expresión, y especialmente la secreción, de proteínas multifuncionales que comprenden uno o dos dominios presentadores de antígeno unidos por disfulfuro formados por un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I, y al menos un dominio variable y un dominio constante de un anticuerpo. Adicionalmente, el rendimiento de la expresión se incrementa en comparación con los complejos no unidos por disulfuro.

Por tanto, en una proteína multifuncional como se informa en el presente documento, pueden estar presentes uno, dos o más dominios presentadores de antígeno unidos por disulfuro que comprenden un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I y uno o más dominios variables de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo, permitiendo todavía la producción recombinante y la secreción de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro usando células eucariotas.

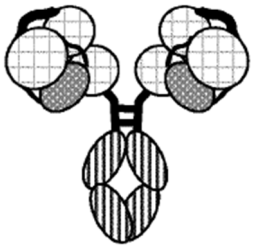
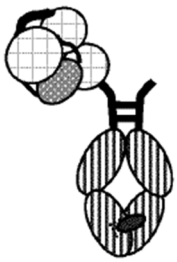
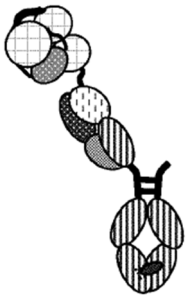
Por tanto, una proteína multifuncional que comprende uno, dos o más dominios presentadores de antígeno unidos por disulfuro de un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I, una región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo, y uno o más dominios variables de un anticuerpo y un dominio constante de un anticuerpo se pueden producir de manera recombinante en y secretarse de células eucariotas.

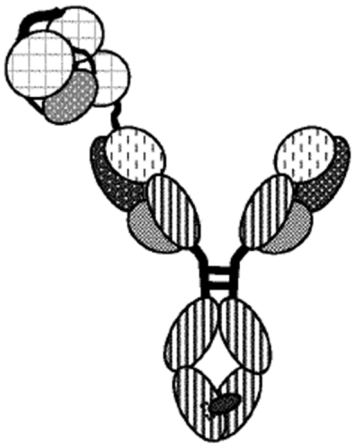
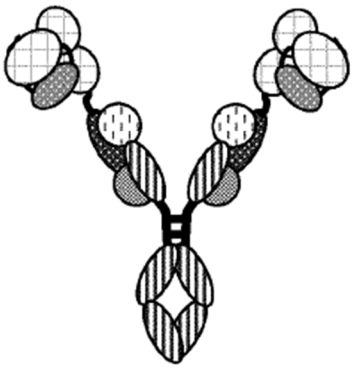
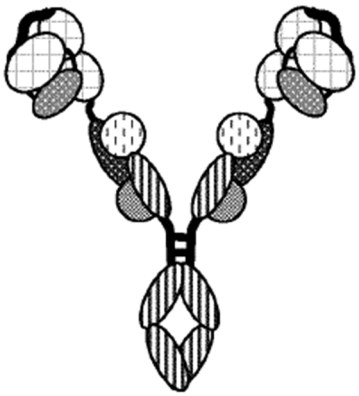
Por tanto, una proteína multifuncional que comprende una región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo, al menos un par de dominios variables de un anticuerpo, opcionalmente un dominio constante de un anticuerpo, y uno, dos o más dominios presentadores de antígeno unidos por disulfuro de un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I se pueden producir de manera recombinante en y secretarse de células eucariotas.

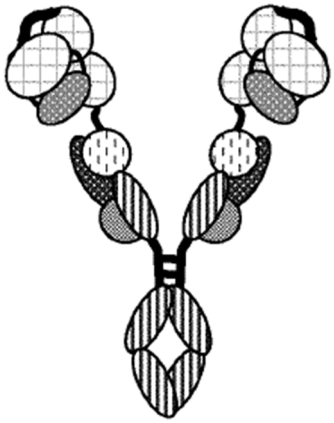
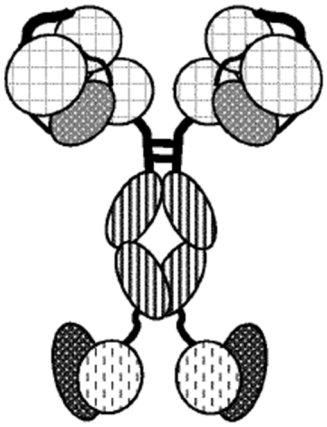
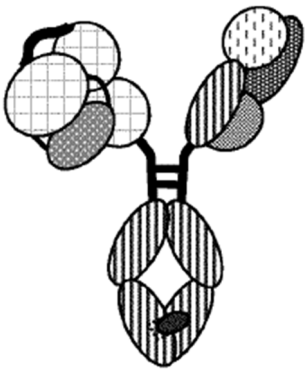
Se sometieron a prueba diversas combinaciones. La expresión secretada de proteínas multifuncionales se puede lograr mediante, por ejemplo, la fusión N terminal de un péptido señal derivado de inmunoglobulina en el que el péptido derivado de virus se fusiona de forma N terminal con la molécula de MHC de clase I. Se puede cambiar el orden de la cadena pesada de la molécula de MHC de clase I (α1-α2-α3 que carece del dominio transmembranario y del citoplasmático) y la cadena ligera (microglobulina β_2). Los diferentes dominios presentadores de antígeno se fusionaron en de forma N terminal con o bien una cadena ligera de un anticuerpo o con una región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende el polipéptido. Las combinaciones ejemplares se muestran en la figura 2.

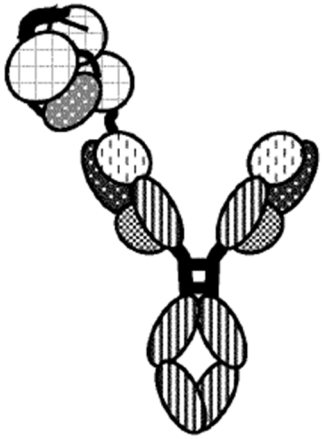
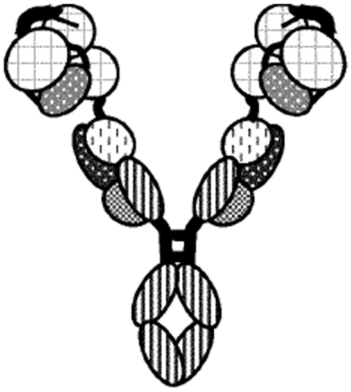
Como se puede observar en la siguiente tabla, las proteínas multifuncionales que comprenden uno, dos o más dominios presentadores de antígeno que contienen un complejo de proteína MHC-I se pueden expresar en presencia de un dominio variable de un anticuerpo y polipéptidos derivados de la región bisagra del anticuerpo cuando los dominios presentadores de antígeno están unidos por disulfuro. Además, se incrementa el rendimiento obtenible.

Tabla.

	número de polipéptidos de fusión de MHC de clase I-péptido derivado de virus	número de dominios variables	número de dominios constantes	dominio presentador de antígeno unido por disulfuro	contiene una región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende el polipéptido	nivel de expresión	carril en la figura 3
	2	0	0	no	sí	alto	1
	1	0	0	no	sí	alto	2
	1	1	1	no	sí	alto	3

	1	2	2	no	sí	alto	4
	2	2	2	no	sí	sin expresión	5
	2	2	2	no	sí	sin expresión	6

	2	2	2	no	sí	muy bajo	7
	2	2	0	no	sí	sin expresión	8
	1	1	1	no	sí	alto	9

	1	1	1	sí	sí	alto	n.d.
	2	2	2	sí	sí	alto	n.d.

En algunos modos de realización, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento comprende diferentes pares de polipéptidos. Para permitir el emparejamiento apropiado de los polipéptidos, se puede usar la tecnología de botón en ojal o la tecnología de mAb cruzados para reducir la cantidad de proteína multifuncional no asociada correctamente.

La modificación del botón indica la mutación T366W en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La modificación del ojal indica las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de la modificación del botón y el ojal, puede estar presente la mutación S354C en un dominio CH3 y la mutación Y349C en el otro dominio CH3.

La tecnología de mAB cruzados se informa, por ejemplo, en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080254, WO 2009/080253, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

3. Variantes

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas polipeptídicas de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la

construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes por sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las cadenas polipeptídicas. Se proporcionan cambios ejemplares en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de la cadena lateral de los aminoácidos. Las sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de interés y los productos se pueden cribar para obtener una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

Tabla.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones en el extremo incluyen una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende un polipéptido con un residuo metionilo N terminal. Otras variantes de inserción incluyen la fusión al extremo N o C de las cadenas polipeptídicas de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro con una enzima.

b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización, uno o más polipéptidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro proporcionada en el presente documento se pueden alterar para incrementar o disminuir el grado en que el(los) polipéptido(s) está(n) glucosilado(s). La adición o deleción de sitios de glucosilación a un polipéptido se puede

lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o se suprima uno o más sitos de glucosilación.

La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro comprende una región Fc de anticuerpo y el carbohidrato unido a la misma se puede alterar. Las regiones Fc naturales producidas por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado biantenario que, en general, se enlaza mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa enlazada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunos modos de realización, se pueden hacer modificaciones del oligosacárido en una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que comprende variantes de polipéptido que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa enlazada (directa o indirectamente) a la región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicha región Fc puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras enlazadas a Asn297 (por ejemplo, estructuras de proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, híbridas y de alto contenido en manosa) que se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "deficitario en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A., *et al*., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al*., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lee13 deficitarias de fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al*., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; el documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con desactivación génica, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con desactivación génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al*., Biotech. Bioeng., 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., *et al*., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan además proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro que comprenden variantes de la región Fc con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenario enlazado a la región Fc se bisegmenta por GlcNAc. Dichas variantes pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de la región Fc con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido enlazado a la región Fc. Dichas variantes de la región Fc pueden tener función de CDC mejorada. Las variantes de anticuerpo correspondientes se describen, por ejemplo, en los documentos WO 97/30087; WO 98/58964; y WO 99/22764.

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se puede introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro proporcionada en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de la región Fc que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, que hacen que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro *in vivo* es importante, sin embargo, determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/depleción de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro carezca de unión a FcγR (de ahí que sea probable que carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); la patente de EE. UU. n.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M., *et al*., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R., *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al*., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al*., Blood 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y Glennie, M.J., Blood 103 (2004) 2738-2743). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al*., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Las regiones Fc con función efectora reducida incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos 234, 235, 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (véase, por ejemplo, el documento US 6.737.056). Dichos mutantes de la región Fc incluyen mutantes de la región Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de la región Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de la región Fc con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L., *et al*., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

En determinados modos de realización, una variante de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, bien mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E., *et al*., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al*., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K., *et al*., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de la región Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

Véanse también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento se pueden producir usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro descrita en el presente documento. En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp2/0). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de obtención de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión de los polipéptidos y la formación de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, y opcionalmente, recuperar la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, se aísla un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o vectores de expresión incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, se puede aislar la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el polipéptido, incluyendo cepas de hongos y levaduras, en los que las rutas de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véanse Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H., *et al*., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión de proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro glucosiladas también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en conjunto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L., *et al*., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en in Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *et al*., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR$^-$ (Urlaub G., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero útiles para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicha proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.ª edición, Osol, A. (Ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyenademás, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales

como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Dichos principios activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede lograr fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

D. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Cualquiera de las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro proporcionadas en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

En otros aspectos, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer.

En determinados aspectos, se proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento.

En determinados aspectos de la divulgación, la invención proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento. En uno de dichos aspectos, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En otros modos de realización, la invención proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en la supresión de células cancerosas o células infectadas por virus. En determinados aspectos, la invención proporciona una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de supresión de células cancerosas o células infectadas por virus en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para suprimir las células cancerosas. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto como se divulga en el presente documento, el medicamento es para el tratamiento del cáncer o de una infección vírica. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o de una infección vírica que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer o una infección vírica una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos aspectos, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En otro aspecto, el medicamento es para la supresión de células cancerosas

o de células infectadas por virus. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de supresión de células cancerosas o de células infectadas por virus en un individuo que, comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para suprimir células cancerosas o células infectadas por virus. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar el cáncer o una infección vírica. En un aspecto, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer o infección vírica una cantidad eficaz de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento. En uno de dichos aspectos, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores puede ser un ser humano.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para la supresión de células cancerosas o de células infectadas por virus en un individuo. En un aspecto, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para suprimir células cancerosas o células infectadas por virus. En un aspecto, un "individuo" es un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro como se informa en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional.

Las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro de la invención se pueden usar bien solas o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Las proteínas multifuncionales de la invención también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen pero no se limitan a administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración intravenosa rápida, e infusión pulsada.

Las proteínas multifuncionales multivalentes unidas por disulfuro de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera concordante con una buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la invención (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se administra para fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta a la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, y del criterio del médico responsable. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de proteína multifuncional multivalente unida

por disulfuro puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se mantendrá hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar de la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado como se divulga en el presente documento en lugar de o además de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer o una infección vírica en un paciente, en el que la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se debe administrar antes, simultáneamente o después de la inmunización del paciente con el péptido derivado de virus comprendido en la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o de una infección vírica en combinación con inmunización contra el péptido derivado de virus comprendido en la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro.

En la primera etapa, el péptido derivado de virus que está contenido en la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro se administra en primer lugar al individuo que se va a tratar. En un determinado lapso de tiempo posterior, es decir, entre 4 días y 28 días, la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento se administra al individuo.

Mediante esta aplicación sucesiva y separada del polipéptido derivado de virus, en la primera etapa solo y en la segunda etapa en la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro como se informa en el presente documento, es posible incrementar el número de linfocitos T específicos de péptido derivado de virus y, por tanto, incrementar la eficacia del tratamiento.

III. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas con solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una proteína multifuncional de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este aspecto de la divulgación puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado como se divulga en el presente documento en lugar de o además de una proteína multifuncional como se informa en el presente documento.

IV. OTROS ASPECTOS DE LA DIVULGACIÓN

1. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos o más dominios presentadores de antígeno,
- una región Fc de anticuerpo, y
- uno o más sitios de unión a antígeno,

en la que cada uno de los dominios presentadores de antígeno comprende independientemente el uno del otro en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el sitio o sitios de unión a antígeno se unen a un antígeno de superficie de células cancerosas o un antígeno de superficie de células infectadas por virus, y

en la que uno o más de los dominios presentadores de antígeno tienen residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

2. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno,
- una región Fc de anticuerpo, y
- uno o más sitios de unión a antígeno,

en la que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el sitio o sitios de unión a antígeno se unen a un antígeno de superficie de células cancerosas o un antígeno de superficie de células infectadas por virus, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

3. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 2, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende un primer y segundo polipéptidos de la región Fc unidos por enlaces disulfuro, por medio de lo cual el sitio de unión a antígeno o uno de los sitios de unión a antígeno comprende el primer polipéptido de la región Fc y el segundo sitio de unión a antígeno, si está presente, comprende el segundo polipéptido de la región Fc.

4. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizada por que los sitios de unión a antígeno comprenden independientemente entre sí i) un par de una cadena pesada de un anticuerpo y una cadena ligera de un anticuerpo, o ii) un polipéptido de fusión scFv que comprende en la dirección N a C terminal un fragmento de anticuerpo scFv y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo, o iii) un polipéptido de fusión scFab que comprende en la dirección N a C terminal un scFab y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo.

5. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, caracterizada por que i) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N de la cadena pesada o al extremo N de la cadena ligera de un sitio de unión a antígeno, o ii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N de la cadena pesada o a cada extremo N de la cadena ligera de cada sitio de unión a antígeno, o iii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo C de la cadena pesada o al extremo C de la cadena ligera del sitio de unión a antígeno, o iv) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo C de la cadena pesada o a cada extremo C de la cadena ligera de cada sitio de unión a antígeno, o v) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFv, o vi) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFv, o vii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFab, o viii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFab, o ix) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc, o x) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del primer polipéptido de la región Fc y un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc.

6. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5, caracterizada por que el antígeno de superficie de la célula cancerosa es proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP).

7. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 6, caracterizada por que el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido derivado de virus.

8. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 7, caracterizada por que el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T $CD8^+$.

9. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 7 a 8, caracterizada por que el péptido derivado de virus es un péptido derivado del citomegalovirus humano.

10. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, caracterizada por que el péptido derivado de virus tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70.

11. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizada por que el péptido derivado de virus tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.

12. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 11, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-C*0304, HLA-C*0401 y HLA-C*0702.

13. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 12, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar la proteína multifuncional de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0301, HLA-B*0702, HLA-B*0801, HLA-B*4402, HLA-C*0401, HLA-C*0501, HLA-C*0701 y HLA-C*0702,

- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A* 1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-B*1301, HLA-B*1521, HLA-B*5601, HLA-B*5602, HLA-C*0102, HLA-C*0401, HLA-C*0403 y HLA-C*1502,

- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-C*0202, HLA-C*0304, HLA-C*0401 y HLA-C*0702, y

- para un individuo de origen del sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-B*1504, HLA-C*0102, HLA-C*0304, HLA-C*0702 y HLA-C*0801.

14. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 13, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar la proteína multifuncional de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*0201,

- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402, HLA-B*1301, HLA-C*0102 y HLA-C*0401,

- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402 y HLA-C*0304, y

- para un individuo de origen del sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*2402.

15. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 14, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % se selecciona del grupo que comprende HLA-B*4201, HLA-B*5901, HLA-B*6701 y HLA-B*7802.

16. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 15, caracterizada por que la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana y la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más es HLA-A*0201 humana.

17. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 16, caracterizada por que el dominio presentador de antígeno comprende

(i) un péptido derivado de virus,

(ii) microglobulina β_2,

(iii) el alelo soluble de HLA-A A*0201 y

(iv) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro

o

(i) un péptido derivado de virus,

(ii) el alelo soluble de HLA-A A*0201,

(iii) microglobulina β_2, y

(iv) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

18. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 17, caracterizada por que la microglobulina β_2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

19. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 18, caracterizada por que los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 140 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

20. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 19, caracterizada por que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

21. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 20, caracterizada por que la proteína multifuncional se caracteriza por que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o es una variante de la misma que comprende de 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o es una variante de la misma que comprende de 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 136, y

(vii) el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

22. La proteína multifuncional de acuerdo con el punto 21, caracterizada por que

- el primer péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139, y/o
- el segundo péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, y/o
- el tercer péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136.

23. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 22, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la clase IgG o la clase IgE.

24. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 23, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo se selecciona de una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, o IgG2, o IgG3, o IgG4.

25. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 24, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende al menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, P329, A330 y/o P331 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

26. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 25, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o de la subclase IgG2 humana con las mutaciones L234A y L235A, y/o las mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236, y/o contiene la mutación P329G.

27. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A y/o P329G.

28. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con la mutación S228P y/o L235E.

29. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que el primer y segundo polipéptido de la región Fc de anticuerpo se selecciona independientemente uno del otro del grupo que comprende SEQ ID NO: 87 a 103.

30. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

31. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

32. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende dos polipéptidos de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

33. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

34. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

35. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 26, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y un segundo polipéptido de la región Fc con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

36. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

37. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la

posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

38. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72, y

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

39. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

40. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

41. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP).

42. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprende una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110.

43. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la

posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112.

44. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprende una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro.

45. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a Cterminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

46. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

47. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

48. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos dominios presentadores de antígeno, que comprenden en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

49. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 117 o 137,

- una cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 118,

- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

50. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- dos cadenas polipeptídicas de SEQ ID NO: 117 o 137,

- dos cadenas polipeptídicas cada una de SEQ ID NO: 119,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

51. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

52. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

53. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

54. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

55. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno.

56. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP).

57. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprende una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110.

58. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112.

59. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprende una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro.

60. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- uno o más sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo es uno de los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

61. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 104 a 106 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 108 a 110, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables.

62. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

63. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- un dominio presentador de antígeno, que comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T de SEQ ID NO: 01,

(ii) una microglobulina β_2 de SEQ ID NO: 71, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I de SEQ ID NO: 72,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108 y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro,

- exactamente una región Fc de anticuerpo, que comprende dos polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro, de los cuales el primer polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y el segundo polipéptido de la región Fc unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103, y

- dos sitios de unión a antígeno, que se unen específicamente al proteoglucano asociado al melanoma sulfato de condroitina (MCSP), y que comprenden cada uno una cadena ligera de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 105 a 107 y una cadena pesada de un anticuerpo con un dominio variable que comprende SEQ ID NO: 110 a 112, por medio de lo cual las regiones Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo son los polipéptidos de la región Fc unidos por disulfuro,

en la que el dominio presentador de antígeno se une al extremo N de uno de los dominios variables de cadena pesada.

64. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

65. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio

de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

66. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

67. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

68. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

69. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

70. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113.

71. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo de SEQ ID NO: 113.

72. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión a MCSP comprende SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 113.

73. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116; y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115.

74. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión al MCSP comprende un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de SEQ ID NO: 116 y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo de SEQ ID NO: 115.

75. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 63, caracterizada por que el sitio de unión a MCSP comprende SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 115.

76. Un ácido nucleico que codifica la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de uno cualquiera de los puntos 1 a 75.

77. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico del punto 76.

78. Una formulación farmacéutica que comprende la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

79. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 para su uso como medicamento.

80. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 para su uso en el tratamiento del cáncer o una infección vírica.

81. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 para su uso en la atracción de linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

82. La proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 para su uso en la supresión de células cancerosas o de células infectadas por virus.

83. Uso de la proteína multifuncional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 75 en la fabricación de un medicamento.

84. El uso de acuerdo con el punto 83, en el que el medicamento es para el tratamiento del cáncer o una infección vírica.

85. El uso de acuerdo con el punto 83, en el que el medicamento es para atraer linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

86. El uso de acuerdo con el punto 83, en el que el medicamento es para la supresión de células cancerosas o células infectadas por virus.

V. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de composiciones de la invención.

Ejemplo 1

Procedimiento para el aislamiento y la estimulación de linfocitos T positivos para CD8 específicos de CMV a partir de donantes humanos

Aislamiento de PBL

Se aislaron PBL mediante centrifugación en gradiente de Ficoll a partir de sangre de donante humano (Greiner bio-one, n.º de cat. 227290). Se cultivaron PBL en RPMI enriquecido con suero humano al 5 % (n.º de cat. de Sigma H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, n.º de cat. P04-80100), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n.º de cat. 14001100).

Estimulación de PBL

Las células (2×10^7 células/ml) se cultivaron en medio de cultivo celular enriquecido con 50 µg/ml de péptido derivado de pp65 de CMV (SEQ ID NO: 01) durante dos horas en condiciones de cultivo celular (37 °C, 5 % de CO_2, 80 % de humedad). Posteriormente, la suspensión de células se diluyó 20 veces con medio de cultivo y se cultivó adicionalmente en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de siembra de 2×10^5 células por 96 pocillos. Después de 4 a 5 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2 (Roche, n.º de cat. 11011456001), 25 ng/ml de IL-7 (Peprotech, n.º de cat. 200-01) y 25 ng/ml de IL-15 (Peprotech, n.º de cat. 200-15) y se cultivaron las células durante otros 7 a 8 días. La estimulación de los linfocitos T es visible bajo el microscopio como agrupaciones celulares.

Reestimulación de PBL

Los linfocitos T se cocultivaron con células estimuladoras, que son PBL primarios autólogos pulsados con péptido del mismo donante (o bien recién preparados o derivados de reservas congeladas). Las células estimuladoras se pulsaron con el péptido como se describe anteriormente. Después de las dos horas de incubación del péptido, los PBL se irradiaron (4000 rad, STS GmbH OB29 n.º 9510-5) y se lavaron dos veces en medio de cultivo sin péptido. La reestimulación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con placas de fondo redondo. Se usaron de 8×10^4 a 1×10^5 células estimuladoras por 96 pocillos. Las células del cultivo primario se lavaron dos veces con medio de cultivo, se resuspendieron en 200 µl de medio de cultivo y se transfirieron 80 µl a cada pocillo de las células estimuladoras. Después de 3 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 y 25 ng/ml de IL-15. Las células proliferaron y se expandieron cada 2 a 3 días en pozos nuevos con medio nuevo.

Análisis de linfocitos T

Las células se tiñeron para la expresión de CD8 (BD, n.º de cat. 345772) y de los receptores de linfocitos T específicos de CMV (Prolmmune, n.º de cat. F008-4A-E) y se analizaron en FACS.

Medio de cultivo celular

RPMI1640 (PAN Biotech, n.º de cat. P04-17500), suero humano al 5 % (HS; n.º de cat. de Sigma H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, n.º de cat. P04-80100), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n.º de cat. 14001100).

Resultados

Se realizó un análisis FACS de linfocitos de sangre periférica (PBL) derivados de cuatro donantes humanos. Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con FITC (BD, n.º de cat. 345772) combinado con pentámero Pro5 conjugado con APC (Prolmmune, n.º de cat. F008-4A-E) para teñir los linfocitos T que transportan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce MHC de clase I (HLA-A*0201) cargado con el péptido derivado de CMV (NFVPMVATV (SEQ ID NO: 01)). Para los resultados, véase la figura 4. En el día 0, el donante 1 y 4 transportan un número bajo de linfocitos T CD8 específicos de CMV (0,08 % y 0,1 %, respectivamente). El donante 2 y 3 transportan un número mayor de linfocitos T CD8 específicos de CMV en su sangre periférica (0,25 % y 3,12 %, respectivamente). Catorce días más tarde después de la estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado de CMV, solamente los donantes 2 y 3 muestran un incremento significativo en linfocitos T CD8 específicos de CMV (6,2 % y 71,2 %, respectivamente) mientras que los donantes 1 y 4 no muestran números incrementados de linfocitos T CD8 específicos de CMV (0,01 % y 0,05 %, respectivamente). Otros 14 días más tarde después de una segunda estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado de CMV, los donantes 2 y 3 muestran un incremento adicional en los linfocitos T CD8 específicos de CMV (15,1 % y 96,6 %, respectivamente).

Ejemplo 2

Ensayo de citotoxicidad

Las células MN60 de leucemia linfocítica aguda transportan el alelo de HLA-A A*0201. Las células MN60 (1×10^6 células/ml) se incubaron con 50 µg/ml del péptido pp65 de CMV (SEQ ID NO: 01) durante 45 minutos en condiciones de cultivo celular (37 °C, 5 % de CO_2, 80 % de humedad). La incubación da como resultado un intercambio de péptido en el surco de unión a péptido HLA-A*0201. Las células MN60 con el péptido intercambiado se centrifugaron y se diluyeron a una densidad de 1×10^6 células/ml con PBS (PanBiotech, n.º de cat. P04-36500) y se tiñeron con 1 µM del trazador celular éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen, n.º de cat. 34554) 15 minutos a temperatura ambiente (t.a.). Las células se lavaron posteriormente una vez con PBS y se diluyeron hasta 1×10^5 células/ml con medio AIM-V (Gibco, n.º de cat. 0870112DK). Para el ensayo, las células MN60 (células diana) se cocultivaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos con linfocitos T $CD8^+$ derivados del donante 3 humano específicos de CMV (células efectoras, véase el ejemplo 1) durante cuatro horas en condiciones de cultivo celular. La proporción de células efectoras con respecto a diana era de 4:1. Las células muertas se tiñen con 1 µl/100 µl de yoduro de propidio (PI, Sigma, n.º de cat. P-4864) y se analizaron por FACS.

Resultados

El análisis de citometría de flujo se realizó para analizar la capacidad citolítica de los CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV:

Se realizó un cocultivo de células MN60 no cargadas con el péptido derivado de CMV. Las células MN60 son positivas para FITC. Las células efectoras son negativas para FITC. Las células muertas son positivas para PI, las células vivas son negativas para PI. Más de un 85 % de las células MN60 están vivas cuando no se cargan con el péptido derivado de CMV (Q2 y Q4).

Se realizó un cocultivo de células MN60 cargadas con el péptido derivado de CMV. Más de un 80 % de las células MN60 están muertas (Q2 y Q4) mientras que la proporción de células efectoras vivas y muertas no se altera notablemente entre el análisis por FACS lo que indica una lisis específica de células diana cargadas con péptido de CMV.

Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de los CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV, dependiendo de la proporción de células efectoras con respecto a diana:

El ensayo citotóxico se realizó como se describe anteriormente. Se aplicaron diferentes proporciones de células efectoras con respecto a células diana que variaban de 0,5 células efectoras por célula diana a cuatro células efectoras por célula diana. El tiempo de incubación fue de cuatro horas. Las células MN60 que no se cargaron con el péptido derivado de CMV no muestran un número incrementado de células muertas con una proporción de efectoras con respecto a diana incrementada, es decir, que varía de un 8 % a un 13 % con una proporción de 0,5:1 a 4:1.

Casi un 20 % de las células MN60 cargadas con péptido derivado de CMV ya se destruyen con una proporción baja de efectoras con respecto a diana de 0,5:1 en cuatro horas. El número de células muertas aumenta abruptamente con un incremento en la proporción de efectoras con respecto a diana que alcanza hasta un 83 % a una proporción de 4:1 de células efectoras por célula diana.

Ejemplo 3

Preparación, transfección, expresión, purificación y análisis de ADN

Preparación de ADN

Se recogieron 250 ml de cultivo de LB bacteriano durante la noche y se extrajo ADN de plásmido de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit Maxi de alta velocidad, Qiagen, n.º de cat. 12663). El ADN de plásmido resultante se eluyó en 1 ml de tampón TE y se determinó la concentración de ADN mediante medición espectrofotométrica (Epoch, BioTek).

El vector de expresión final comprendía los siguientes elementos:

- los sitios de restricción endonucleolíticos HindIII, NheI,
- un promotor de CMV,
- una 5'UTR 1 (derivada del CMV humano),
- Intron A,
- una 5'UTR 2,
- un gen de resistencia a la ampicilina,
- un sitio de poli A de BGH (señal de poliadenilación de somatotropina bovina),
- pUC Ori.

Secuencias de aminoácidos de los elementos de la proteína multifuncional que comprenden un péptido derivado de CMV y especificidad de unión a IGF1R (anticuerpo anti-IGF1R):

Péptido pp65 de CMV: SEQ ID NO: 01
NLVPMVATV

Conector 1: SEQ ID NO: 82
GGGGSGGGGSGGGGS

Microglobulina β_2: SEQ ID NO: 71
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Conector 2: SEQ ID NO: 83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

α1-α3 de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 72

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 3: SEQ ID NO: 73
GS

Conector 4: SEQ ID NO: 83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

Conector 13: SEQ ID NO: 136
GSG

Cadena ligera de Ig: SEQ ID NO: 120
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVESKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1) SEQ ID NO: 121
QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
RGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón): SEQ ID NO: 122

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
RGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal): SEQ ID NO: 123

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
RGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Región Fc de la cadena pesada de Ig (variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1): SEQ ID NO: 124

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

scFv: SEQ ID NO: 125

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKCLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
RGTLVSVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP
ATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR
LLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV
YYCQQRSKWPPWTFGCGTKVESK

Secuencias de aminoácidos de los elementos de la proteína multifuncional que comprenden un péptido derivado de CMV y especificidad de unión a MCSP (anticuerpo anti-MCSP):

Péptido pp65 de CMV: SEQ ID NO: 01
NLVPMVATV

Conector 1: SEQ ID NO: 82
GGGGSGGGGSGGGGS

Microglobulina β_2: SEQ ID NO: 71
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Conector 2: SEQ ID NO: 83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

α1-α3 de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 72
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 3: SEQ ID NO: 73
GS

Conector 4: SEQ ID NO: 83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

Conector 13: SEQ ID NO: 136
GSG

Cadena ligera de Ig: MHCI-0008
SEQ ID NO: 126

DIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCSASQGIRNYLNWYQQ
RPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN
LEPEDIATYYCQQYSKLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena ligera de Ig: MHCI-0030 y MHCI-0031
SEQ ID NO: 127
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1)
MHCI-0008
SEQ ID NO: 128
EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWI
RQFPGNKLEWMGYITYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSK
NQFFLKLNSVTTEDTATYYCADFDYWGQGTTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1)
MHCI-0030 y MHCI-0031
SEQ ID NO: 129

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón):
MHCI-0008
SEQ ID NO: 130

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWI
RQFPGNKLEWMGYITYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSK
NQFFLKLNSVTTEDTATYYCADFDYWGQGTTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón):
MHCI-0030 y MHCI-0031
SEQ ID NO: 131

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal):
MHCI-0008
SEQ ID NO: 132

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWI
RQFPGNKLEWMGYITYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSK
NQFFLKLNSVTTEDTATYYCADFDYWGQGTTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal):
MHCI-0030 y MHCI-0031
SEQ ID NO: 133

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región Fc de la cadena pesada de Ig (variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1):
SEQ ID NO: 124

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

scFv: MHCI-0008
SEQ ID NO: 134
EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWI
RQFPGNKLEWMGYITYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSK
NQFFLKLNSVTTEDTATYYCADFDYWGQGTTLTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPSSLSASLGDR
VTISCSASQGIRNYLNWYQQRPDGTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLP
WTFGGGTKLEIK

scFv: MHCI-0030 y MHCI-0031
SEQ ID NO: 135
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQGIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS
KLPWTFGQGTKVEIK

Transfección

Se diluyeron las células HEK 293 hasta 8 × 10^5 células/ml el día antes de la transfección. Se transfectaron aproximadamente de 1 a 1,6 × 10^6 células/ml de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para un volumen de transfección final de 30 ml, se diluyeron 30 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio de suero reducido Opti-MEM® I (Gibco, n.º de cat. 31985070). Se diluyeron igualmente 2 µl de reactivo 293fectin™ (Invitrogen, n.º de cat. 12347019) por 1 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio Opti-MEM® y se incubaron durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadió el ADN diluido al reactivo 293fectin™ diluido, se mezcló suavemente, se incubó durante otros 20-30 minutos y después se pipeteó gota a gota en 28 ml de las células HEK 293 para obtener un volumen final de 30 ml. Las células se incubaron en condiciones de cultivo celular (37 °C, 8 % de CO_2, 80 % de humedad) en un agitador orbital que giraba a 125 rpm y se recogieron después de 72 horas. La extracción se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, durante 10 minutos a 3000 rpm y se filtró a través de un filtro estéril de 22 µm (Millipore, n.º de cat. SCGPU05RE).

Inmunoelectrotransferencia

Se concentraron 500 µl de sobrenadante de cultivo celular con dispositivos centrífugos Pall Nanosep Omega-Membrane 30KD (Pall, n.º de cat. OD030C33) hasta un volumen de 50 µl. Se diluyeron 17,5 µl de cada concentrado hasta un volumen final de 25 µl con tampón de muestra XT (Bio Rad, n.º de cat. 161-0791) 4x y agente reductor XT (BioRad, n.º de cat. 161-0792) 20x, se calentaron durante 8 minutos a 96 °C y se aplicaron sobre un gel prefabricado Criterion XT al 4-12 % (n.º de cat. 345-0124). La transferencia se realizó con célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BioRad) a 20 V durante 30 minutos sobre una membrana de nitrocelulosa pura Trans-blot (0,45 µm) (BioRad, n.º de cat. 162-0117). El bloqueo de la membrana se realizó con reactivo de bloqueo de electrotransferencia (Roche,

n.º de cat. 11921681001) 1x durante una hora a temperatura ambiente. La tinción se realizó con anticuerpos policlonales de conejo contra la cadena ligera κ humana conjugados con peroxidasa (DAKO, n.º de cat. P0129, diluido 1:3000) y conjugado de HRP con anticuerpos policlonales de conejo contra IgG humana (DAKO, n.º de cat. P0214, diluido 1:5000) durante una hora a temperatura ambiente. La detección de luminiscencia se llevó a cabo con LUMI-Imager F1 (Roche).

Purificación

Las células se extrajeron del medio de cultivo mediante centrifugación. Las proteínas multifuncionales se purificaron de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con proteína A (MabSelect-sefarosa sobre un sistema ÄKTA-Avant). Las proteínas multifuncionales eluidas se concentraron con tubos de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 3 mg/ml. Se analizó una alícuota en cromatografía de exclusión por tamaño (TSKgel GFC300 Sys89 de HPLC). Se realizó la SEC preparativa en una columna Superdex 200 para eliminar los agregados y tamponar las proteínas de fusión en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las proteínas multifuncionales eluidas se concentraron con un tubo de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml y se filtraron de manera estéril (tamaño de poro de 0,2 µm).

Análisis

Las muestras de proteína multifuncional se analizaron mediante OD280 usando un espectrofotómetro UV para determinar la concentración de proteína en solución. El coeficiente de extinción requerido para esto se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace (Pace, *et al*., Protein Science 4 (1995) 2411-2423). La cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) se realizó en columnas TSK-Gel300SWXL o Superdex 200 con un tampón de fosfato de potasio 0,2 M, que comprende KCl 0,25 M, pH 7,0 como fase móvil con el fin de determinar el contenido de especies monoméricas, agregadas y degradadas en las muestras. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) (reductora y no reductora) se realizó para analizar la pureza de las preparaciones de proteína multifuncional con respecto a los productos de degradación relacionados con el producto y las impurezas no relacionadas. La espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) se realizó con muestras reducidas (TCEP) y desglucosiladas (N-glucosidasa F) para confirmar la masa/identidad correcta de cada cadena y detectar modificaciones químicas. La ESI-MS de las muestras desglucosiladas se llevó a cabo para analizar la naturaleza y la calidad de la proteína completamente ensamblada y detectar posibles productos secundarios relacionados con el producto.

Procedimiento SDS-PAGE y tinción de Coomassie

Dispositivo:	Minicélula XCell Sure Lock de Invitrogen
Gel:	Gel de tris-glicina al 4-20 %, Invitrogen EC6025BOX
Tampón:	Tampón de electroforesis de tris-glicina SDS (10x), Invitrogen LC2675-5
Tampón de muestra:	Tampón de muestra de tris-glicina SDS (2x), Invitrogen LC2676
Tampón reductor:	Agente reductor de muestras NuPAGE (10x), Invitrogen NP0004
Marcador de masa molecular:	Mark 12, estándar de PM, Invitrogen LC5677

Preparación de muestra de proteína

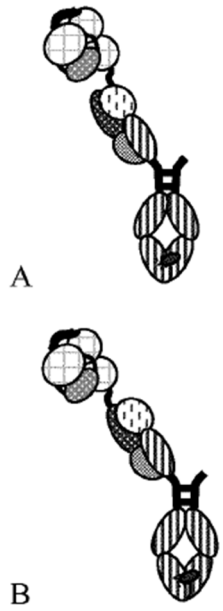
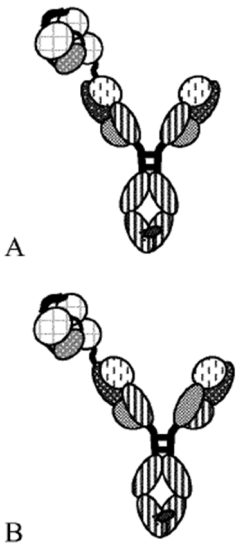
La muestra se ajustó hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml con tampón. Para la reducción de la muestra se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

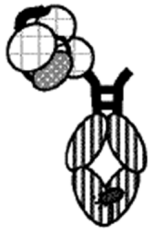
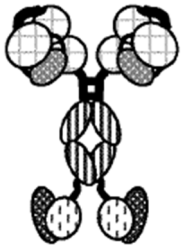
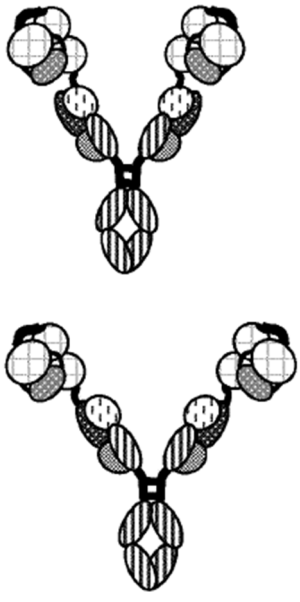
- tampón reductor: 4 ml de tampón de muestra (2x) y 1 ml de tampón reductor (10x)
- diluir la muestra 1:1 con tampón reductor
- incubar durante 5 minutos a 70 °C

La electroforesis en gel se llevó a cabo a 125 V durante 90 minutos. Los geles se tiñeron con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, n.º de cat. LC6065).

Resultados

Tabla.

N.º	polipéptidos comprendidos en la proteína multifuncional con especificidad de unión a IGF-1R	esquema	rendimiento
1	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal] 2. Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón) 3. Cadena ligera de Ig		5 mg/l
2	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal] 2. Variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1 3. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig		A: 5-18 mg/l
3	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal] 2. Mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón 3. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig		A: 4-23 mg/l

4	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal] 2. Mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón		4 mg/l
5	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[región Fc de L234A, L235A de IgG1]		4 mg/l
6	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1]-[conector 4]-[scFv]		< 1 µg/l
7	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1] 2. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig		< 1 µg/l

El gel de SDS con tinción de Coomassie y los cromatogramas de SEC correspondientes de proteínas multifuncionales seleccionadas con una estructura correspondiente al número 1, 2A y 3A de acuerdo con la tabla previa se muestran en las figuras 5 y 6. Se puede observar que se pueden obtener proteínas multifuncionales definidas.

Ejemplo 4

Unión de proteína multifuncional MHC-I-anti-IGF-1R a línea celular positiva para IGF-1R humano

Las células H460M2 se diluyeron hasta 8 × 10^5 células/ml en medio AIM-V (Gibco, n.º de cat. 0870112DK). Se tiñeron 500 µl de la suspensión celular con 10 µg de una proteína multifuncional MHC-I-anti-IGF-1R como se informa en el

presente documento bien a 4 °C o 37 °C durante una hora. Posteriormente, las células se lavaron una vez con medio AIM-V enfriado con hielo y se tiñeron con un segundo anticuerpo, que era un anticuerpo caprino $F(ab')_2$ contra IgG (H+L) humana conjugado con R-PE (Dianova, n.º de cat. 109-116-088, dilución 1:50) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con medio AIM-V enfriado con hielo y se midió la fluorescencia por medio de FACS Canto II (BD Bioscience) con activación en las células vivas. Un anticuerpo biespecífico sirvió como control de isotipo, un anticuerpo anti-IGF-1R (véase, por ejemplo, los documentos WO 2004/087756 y WO 2007/115814) sirvió como control positivo.

Resultados

Considerando el desplazamiento en la medición de fluorescencia de PE (eje de abscisas), la proteína multifuncional MHC-I-anti-IGF-1R como se informa en el presente documento no muestra diferencia visible en la unión a células diana H460M2 en comparación con el anticuerpo de control. Tampoco hay diferencia si la incubación con la proteína multifuncional MHC-I-anti-IGF-1R se logra a 4 °C o 37 °C. Ni la incubación con el control de isotipo ni con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia solo muestran ningún desplazamiento en la medición de fluorescencia de PE. A pesar de la fusión de la molécula de MHC de clase I, el dominio variable del anticuerpo de la proteína multifuncional MHC-I-anti-IGF-1R en el presente documento todavía se une a las células diana H460M2.

Ejemplo 5

Supresión *in vitro* de células que expresan antígeno

Se sembraron células diana I24 (1×10^5 células/ml) en medios de cultivo celular (RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM y FCS al 10 % (v/p)) en placas de fondo de vidrio WillCo (FA. WillCo Wells BV, REF GWST-3522) durante 24 a 48 horas. Las placas de fondo de vidrio WillCo se recubrieron previamente con 50 µg/ml de clorhidrato de poli-L-lisina (Sigma Aldrich, n.º de catálogo P2658) por placa durante 30 min. Después del recubrimiento, las placas se enjuagaron a fondo con agua estéril de grado de cultivo tisular y se secaron durante dos horas.

Después de extraer los medios de cultivo celular de cultivo y la proteína multifuncional de unión a IGF-1R que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β_2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en la que la proteína multifuncional se une específicamente al IGF-1R humano como se informa en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) se añadió en una concentración final de 5 µg/ml en tampón HEPES de solución Krebs Ringer de K^+ 3 mM, pH 7,3 (enriquecido con DL-ditiotreitol 0,5 mM, ácido ascórbico 1 mM y glutatión 4 mM).

Se añadieron linfocitos T en una proporción de células diana con respecto a células efectoras de 1:10. La obtención de imágenes se realizó durante 4 horas con un microscopio Zeiss Axiovert 135.

Resultados

La proteína multifuncional de unión a IGF-1R medió la lisis de IGF-1R humano que expresa células I24 3T3 (células grandes de crecimiento adherente). La lisis está mediada por linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas bien con forma redonda o células migratorias de ameboides). Las células I24 se incuban con la proteína multifuncional a una concentración de 5 µg/ml y linfocitos T específicos de CMV humano (preactivados con HLA-A0201$^+$/APC pulsadas con péptido de CMV). Obsérvese la interacción de las células I24 con los linfocitos T a los 56 min y a los 76 min y, subsecuentemente, el colapso de la célula I24 después de 125 min.

Se realizó un control que muestra la ausencia de lisis de las células I24 3T3 (células grandes de crecimiento adherente, punta de flecha blanca) a través de linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas bien con forma redonda o células migratorias de ameboides) en ausencia de una proteína multifuncional de unión a antígeno como se informa en el presente documento. Las células I24 se incuban con linfocitos T citotóxicos específicos (preactivados con HLA-A0201$^+$/APC pulsadas con péptido de CMV). El lapso de tiempo se indica debajo de la imagen respectiva.

Ejemplo 6

Ensayo de citotoxicidad

El medio de cultivo celular (50 µl) se pipeteó en cada pocillo de una placa E de 96 pocillos Xcelligence (Roche, n.º de cat. 05232368001) para realizar la medición de fondo.

Las células I24 se diluyeron hasta 1×10^6 células/ml en medios de cultivo celular (RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM, FCS al 10 % (v/p)) y se pipetearon 50 µl (2×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Xcelligence hasta un volumen final de 100 µl y se cultivaron durante 24 horas (37 °C, 8 % de CO_2, 80 % de humedad). Después de 24 horas, se extrajo el medio y las células se lavaron con 200 µl

de medio AIM-V (medio de linfocitos T de medio libre de suero (Invitrogen) (n.º de cat.): 12055-083). La proteína multifuncional de unión a 1GF-1R que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β_2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en la que la proteína multifuncional se une específicamente al IGF-1R humano, se añadió a las células diana lavadas en una concentración final de 1 µg/ml en medio AIM-V. Se añadieron las células efectoras en la proporción respectiva en medio AIM-V hasta un volumen final de 150 µl. El anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (anticuerpo anti-IGF-1R afucosilado) y el anticuerpo antidigoxigenina humana de no unión (anticuerpo antidigoxigenina) sirvieron como control de isotipo y control de anticuerpo específico, respectivamente. La medición se realizó durante 6 a 9 horas respectivamente con el sistema Xcelligence (Roche).

Resultados

La proteína multifuncional de unión a IGF-1R desencadena la lisis de células tumorales H460M2 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Las células tumorales se incubaron durante 4 horas con 1 µg/ml de la proteína multifuncional que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β_2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en la que la proteína multifuncional se une específicamente al IGF-1R humano, y a linfocitos T específicos en la proporción respectiva (de 1:1,5 a 1:0,5) (véase la figura 8). El porcentaje de lisis se indica por encima de las barras respectivas. El anticuerpo monoclonal de IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (MAB IGF-1R-afu) no desencadenó una lisis de células tumorales significativa.

La proteína multifuncional como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células diana I24 3T3 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Las células diana se incubaron durante 4 horas con 1 µg/ml de una proteína multifuncional de unión a antígeno que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β_2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en la que la proteína multifuncional se une específicamente al IGF-1R humano, y a linfocitos T específicos en la proporción respectiva (de 1:1,5 a 1:0,5) (véase la figura 9). El porcentaje de lisis se indica por encima de las barras respectivas. El anticuerpo monoclonal de IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (anticuerpo afucosilado anti-IGF-1R) y el anticuerpo antidigoxigenina humana de no unión (anticuerpo antidigoxigenina) no desencadenaron una lisis de células diana significativa.

Ejemplo 7

Eficacia *in vitro*

La línea celular H460M2 de adenocarcinoma de pulmón positiva para IGF-1R se incubó con 1 µg/ml de una proteína multifuncional que comprende un péptido derivado de hCMV y un anticuerpo anti-IGF-1R y linfocitos T positivos para CD8 específicos de CMV humano en una proporción baja de células efectoras con respecto a células diana (de 1,5 a 0,5 linfocitos T específicos por célula tumoral). El anticuerpo de control fue un anticuerpo anti-IGF-1R glucomodificado. El tiempo de incubación fue de 6 horas. La incubación con la proteína multifuncional da como resultado una supresión potente de las células tumorales H460M2.

Ejemplo 8

Unión de diferentes proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP a células diana positivas para MCSP

se incubaron células Colo38 durante 5 min. con Accutase (PAA, n.º de cat. L11-007) para obtener una suspensión de células sueltas. Se incubaron 2×10^5 células por vial con 1 µg/ml de construcción de proteína multifuncional MHC-I-anti-MCSP en 100 µl de PBS/FCS al 2 % durante 45 min, a 4 °C. Después de la incubación, se lavaron las células con 1 ml de PBS frío/FCS al 2 % y se centrifugaron durante 7 min con 910 rpm. Se resuspendieron las células en 100 µl de PBS/FCS al 2 % con anticuerpo secundario (conjugado anticuerpo caprino contra IgG1 humana-PE, Jackson Lab., n.º de cat. 109-116-088) a 2 µg/ml y se incubaron durante otros 45 min, a 4 °C. Se lavaron las células dos veces con 1 ml de PBS/FCS al 2% y se midieron con un citómetro de flujo BD Canto II. Los resultados se muestran en la figura 7.

Ejemplo 9

Incubación de células positivas para MCSP con proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP

Se incubaron células Colo38 o WM266-4 durante 5 min con Accutase (PAA, n.º de cat. L11-007) para obtener una suspensión de células sueltas. Se incubaron 2×10^4 células de la línea celular Colo38 o 1×10^4 células de la línea celular WM266-4 por pocillo durante 24 h en Eplates96 (Roche, n.º de cat. 05232368001) en 100 µl del medio de cultivo celular respectivo (línea celular Colo38: RPMI1640 enriquecido con glutamina 2 mM, FCS al 10 %; línea celular WM-266-4: RPMI1640 enriquecido con glutamina 2 mM, FKS al 10 %, piruvato de sodio 2 mM, NEAA 2 mM) y se midió la adherencia (impedancia) cada 15 min con la tecnología ACEA (Xcelligence RTCA). Después de 24 h (fase de crecimiento no perturbado), las células se lavaron con 200 µl de medio AIMV (Gibco, n.º de cat. 0870112DK). Se añadieron a las células proteínas multifuncionales MHC-I-anti-MCSP en una concentración final de 1 µg/ml junto con linfocitos T o PBMC estimulados en diferentes proporciones hasta un volumen final de 150 µl en medio AIMV. La incubación se continuó durante otras 4 a 48 horas con medición simultánea de ACEA cada 5 minutos. La lectura se basa en la medición de la impedancia, detectando células lisadas o colapsadas como separadas del fondo de Eplate. El índice de células se ha normalizado a 1 en el primer punto de medición después de la adición de la proteína multifuncional. Los resultados para 1 µg/ml de concentración de proteína multifuncional (MHCI-0008 (1), MHCI-0010 (2), MHCI-0030 (3), MHCI-0031 (4)), proporción de células efectoras con respecto a diana de 10:1; PBMC del donante 3 (200.000 células, el donante 3 es positivo para el CMV pero negativo para el EBV) y la línea celular tumoral de melanoma Colo38 (20.000 células) y por 96 pocillos, los datos son triplicados, se muestran en la figura 14. Los resultados para 1 µg/ml de concentración de proteína multifuncional (MHCI-0008 (1), MHCI-0010 (2), PBMC solamente (3)), proporción de células efectoras con respecto a diana de 10:1; PBMC del donante 3 (200.000 células, el donante 3 es positivo para el CMV pero negativo para el EBV) y la línea celular tumoral de melanoma Colo38 (20.000 células) y por 96 pocillos, los datos son triplicados, se muestran en la figura 15A (Colo38) y 15B (WM266).

Ejemplo 10

Ensayo de citotoxicidad

El medio de cultivo celular (50 µl) se pipeteó en cada pocillo de una placa E de 96 pocillos Xcelligence (Roche, n.º de cat. 05232368001) para realizar la medición de fondo.

Las células Colo38 se diluyeron hasta 1×10^6 células/ml en medios de cultivo celular (RPMI 1640 enriquecido con glutamina 2 mM, FCS al 10 %) y se pipetearon 50 µl (2×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Xcelligence hasta un volumen final de 100 µl y se cultivaron durante 24 horas (37 °C, 8 % de CO_2, 80 % de humedad). Después de 24 horas, se extrajo el medio y las células se lavaron con 200 µl de medio AIM-V (medio de linfocitos T de medio libre de suero (Invitrogen) (n.º de cat.): 12055-083). Las proteínas multifuncionales de unión a MCSP MHCI-0008 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV), MHCI-0010 (monovalentes, control cargadas con péptido de EBV), MHC-0026 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, control de no unión), MHCI-0030 (monovalentes, cargadas con péptido de CMV, activas) y MHCI-0031 (bivalentes, cargadas con péptido de CMV, activas) se añadieron individualmente a las células diana lavadas en una concentración final de 1 µg/ml en medio AIM-V. Se añadieron las células efectoras en la proporción respectiva de 10:1 (E:T) en medio AIM-V hasta un volumen final de 150 µl. La medición se realizó 42 horas después de la adición con el sistema Xcelligence (Roche).

Los resultados obtenidos para 200.000 PBMC (células efectoras) recién aisladas del donante 3 cocultivadas con 20.000 células Colo38 adherentes (placas de 96 pocillos por triplicado) se muestran en la figura 16 (lisis de las células después de 42 horas de incubación con proteína multifuncional). Un 25 % de las PBMC son linfocitos T positivos para CD8, de los cuales, a su vez, un 3 % son específicos del péptido pp65 de CMV, lo que da como resultado aprox. 1500linfocitos T CD8+ específicos del péptido pp65 de CMV por 20.000 células diana Colo38 (E:T real (proporción de células efectoras con respecto a diana) = 1:13).

Resultados

La proteína multifuncional de unión a MCSP desencadena la lisis de células tumorales Colo38 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Ejemplo 11

Ensayo de liberación de LDH

Se centrifugaron placas de ACEA durante 7 min a 910 rpm. Se transfirieron 50 µl de sobrenadantes de ACEA a otra placa de fondo plano de 96 pocillos (Costar). El reactivo LDH (kit de detección de citotoxicidad, Roche, n.º de cat. 11644793001) 1 y 2 se diluyen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se añaden 50 µl de la solución al sobrenadante. La absorción se detectó después de un período de incubación de 5 a 25 minutos en Tecan Reader Sunrise (Tecan). La lisis total se detecta a través de la adición de Triton X-100 al 1 % (n.º de cat. de Sigma T-8787) a las células diana antes de la centrifugación.

Los resultados obtenidos para 200.000 PBMC (células efectoras) recién aisladas del donante 3 cocultivadas con 20.000 células Colo38 adherentes (placas de 96 pocillos por triplicado) se muestran en la figura 17 (liberación de LDH después de 48 horas de incubación con proteína multifuncional). Se cocultivaron 200.000 PBMC recién aisladas del

donante 3 con 20.000 células Colo38 adherentes (placas de 96 pocillos por triplicado). Un 25 % de las PBMC son linfocitos T positivos para CD8, de los cuales, a su vez, un 3 % son específicos del péptido pp65 de CMV, lo que da como resultado aprox. 1500 linfocitos T CD8+ específicos del péptido pp65 de CMV por 20.000 células diana Colo38 (E:T (proporción de células efectoras con respecto a diana) = 1:13).

Resultados

La proteína multifuncional de unión a MCSP desencadena la lisis de células tumorales Colo38 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Ejemplo 12

Ensayo de citotoxicidad

Se obtuvieron PBMC de la sangre completa por medio de centrifugación de Ficoll, se diluyeron 1×10^7 PBMC por ml en medio de linfocitos T (RPMI 1640 enriquecido con HS al 10 %, glutamina 2 mM) y el intercambio de péptidos en las moléculas de HLA-A0201 se logró mediante la adición de 50 µg/ml de péptido pp65 de CMV a la suspensión. Después de 2-3 h de incubación, las PBMC se diluyeron 1:10 y se sembraron a 200 µl en placas de fondo redondo de 96 pocillos. El día 3, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 e IL-15. Después de 14 d se realizó una reestimulación.

Los linfocitos T estimulados se lavaron dos veces en las placas de 96 pocillos y se diluyeron en 200 µl de medio de linfocitos T, del cual se transfirieron 80 µl a nuevas placas de fondo redondo de 96 pocillos.

Las PBMC se estimularon de acuerdo con el protocolo anterior. Las PBMC estimuladas se irradiaron después del intercambio de péptidos con 4000 grays, se lavaron con medio de linfocitos T dos veces y se pipetearon 1×10^5 PBMC a los 80 µl de linfocitos T. El día 3, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 e IL-15. Se realizó un ensayo de citotoxicidad Xcelligence con linfocitos T reestimulados el día 11.

Un 63 % de las células efectoras son linfocitos T $CD8^+$ específicos del péptido pp65 de CMV.

La proporción de células diana con respecto a células efectoras fue de 1:3,5. La lisis celular se determinó 10 horas después de la adición de la proteína multifuncional respectiva. La proteína de fusión multifuncional se añadió a una concentración final de 1 µg/ml.

Los resultados se muestran en la figura 18A para células Colo38 y en la figura 18B para células WM266.

Ejemplo 13

Proteínas multifuncionales estabilizadas por disulfuro

Se ha introducido un puente disulfuro entre la posición 11 y 227 del dominio presentador de antígeno en la proteína multifuncional como se informa en el presente documento.

La secuencia de aminoácidos del dominio presentador de antígeno estabilizado con disulfuro es:

NLVPMVATVGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCY
VSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEY

ACRVNHVTLSQPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRY
FFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPE
YWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSD
WRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVA
EQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLR
CWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWGSGQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTV
SGGSITSGYYWNWIRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI
EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 137).

Sin estabilización con disulfuro, se pueden obtener 6,4 mg de proteína multifuncional a partir del sobrenadante de 11 cultivos después de la purificación por afinidad con proteína A. El rendimiento final después de la cromatografía de exclusión por tamaño para separar los agregados fue de 2,2 mg.

Con estabilización con disulfuro, se pueden obtener 17,8 mg de proteína multifuncional a partir del sobrenadante de 11 cultivos después de la purificación por afinidad con proteína A. El rendimiento final después de la cromatografía de exclusión por tamaño fue de 11,4 mg debido a una menor cantidad de agregados debido a la estabilidad térmica incrementada por el puente disulfuro introducido.

En la figura 19 se muestran los cromatogramas de exclusión por tamaño analítica después de la cromatografía de afinidad con proteína A, pero antes de la extracción del agregado mediante cromatografía de exclusión por tamaño preparativa.

Las proteínas multifuncionales unidas por disulfuro muestran la misma funcionalidad que las proteínas multifuncionales no unidas por disulfuro (véase la figura 20).

Se obtuvieron PBMC de la sangre completa por medio de centrifugación de Ficoll, se diluyeron 1×10^7 PBMC por ml en medio de linfocitos T (RPMI 1640 enriquecido con HS al 10 %, glutamina 2 mM) y el intercambio de péptidos en las moléculas de HLA-A0201 se realizó mediante la adición de 50 µg/ml de péptido pp65 de CMV a la suspensión. Después de 2-3 h de incubación, las PBMC se diluyen 1:10 y se sembraron a 200 µl en placas de fondo redondo de 96 pocillos. El día 3, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 e IL-15. Las células se tomaron 11 d después de la estimulación primaria; un 45 % de las células eran específicas de CMV. En la figura 20 se muestran los resultados para una proporción de células dianas con respecto a células efectoras de 1:3.

Las proteínas multifuncionales unidas por disulfuro muestran una estabilidad térmica incrementada (figura 21).

Ejemplo 14

Preparación, transfección, expresión, purificación y análisis de ADN

Preparación de ADN

Se recogieron 250 ml de cultivo de LB bacteriano durante la noche y se extrajo ADN de plásmido de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit Maxi de alta velocidad, Qiagen, n.º de cat. 12663). El ADN de plásmido resultante se eluyó en 1 ml de tampón TE y se determinó la concentración de ADN mediante medición espectrofotométrica (Epoch, BioTek).

El vector de expresión final comprendía los siguientes elementos:

- los sitios de restricción endonucleolíticos HindIII, NheI,
- un promotor de CMV,
- una 5'UTR 1 (derivada del CMV humano),
- Intrón A,
- una 5'UTR 2,
- un gen de resistencia a la ampicilina,
- un sitio de poli A de BGH (señal de poliadenilación de somatotropina bovina),
- pUC Ori.

Secuencias de aminoácidos de los elementos de una proteína multifuncional unida por disulfuro monovalente ejemplar que comprende un péptido derivado de CMV y especificidad de unión a MCSP (anticuerpo anti-MCSP):

Péptido pp65 de CMV: SEQ ID NO: 01
NLVPMVATV

Conector 1: SEQ ID NO: 139
GCGGSGGGGSGGGGS

Microglobulina β_2: SEQ ID NO: 71
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Conector 2: SEQ ID NO :83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

α1-α3 de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 140
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 13: SEQ ID NO: 136
GSG

Cadena ligera de Ig: SEQ ID NO: 127

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con variación de botón):
SEQ ID NO: 141
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con variación de ojal):
SEQ ID NO: 142
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región Fc de la cadena pesada de Ig (variante de botón de la región Fc de mutantes L235A, P329G de IgG1):
SEQ ID NO: 98

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

Secuencias de aminoácidos de los elementos de una proteína multifuncional unida por disulfuro divalente ejemplar que comprende un péptido derivado de CMV y especificidad de unión a MCSP (anticuerpo anti-MCSP):

Péptido pp65 de CMV: SEQ ID NO: 01
NLVPMVATV

Conector 1: SEQ ID NO: 139
GCGGSGGGGSGGGGS

Microglobulina β_2: SEQ ID NO: 71
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Conector 2: SEQ ID NO: 83
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

α1-α3 de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 140
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 13: SEQ ID NO: 136
GSG

Cadena ligera de Ig: SEQ ID NO: 127
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con variación de botón):
SEQ ID NO: 142

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con mutación de ojal):
SEQ ID NO: 141

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencias de aminoácidos de los elementos de una proteína multifuncional unida por disulfuro divalente ejemplar que comprende un péptido derivado de CMV y especificidad de unión a MCSP (anticuerpo anti-MCSP):

Péptido pp65 de CMV: SEQ ID NO: 01

NLVPMVATV

Conector 1: SEQ ID NO: 139

GCGGSGGGGSGGGGS

α1-α3 de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 140

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 2: SEQ ID NO: 77
GGGGSGGGGSGGGGS

Microglobulina β_2: SEQ ID NO: 71
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Conector 13: SEQ ID NO: 81
GGGGSGGGGS

Cadena ligera de Ig: SEQ ID NO: 127
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con variación de botón):
SEQ ID NO: 142
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con mutación de ojal):
SEQ ID NO: 141

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNW
IRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Transfección

Se diluyeron las células HEK 293 hasta 8 × 10^5 células/ml el día antes de la transfección. Se transfectaron aproximadamente de 1 a 1,6 × 10^6 células/ml de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para un volumen de transfección final de 30 ml, se diluyeron 30 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio de suero reducido I Opti-MEM® (Gibco, n.º de cat. 31985070). Se diluyeron igualmente 2 µl de reactivo 293fectin™ (Invitrogen, n.º de cat. 12347019) por 1 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio Opti-MEM® y se incubaron durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadió el ADN diluido al reactivo 293fectin™ diluido, se mezcló suavemente, se incubó durante otros 20-30 minutos y después se pipeteó gota a gota en 28 ml de las células HEK 293 para obtener un volumen final de 30 ml. Las células se incubaron en condiciones de cultivo celular (37 ºC, 8 % de CO_2, 80 % de humedad) en un agitador orbital que giraba a 125 rpm y se recogieron después de 72 horas. La extracción se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, durante 10 minutos a 3000 rpm y se filtró a través de un filtro estéril de 22 µm (Millipore, n.º de cat. SCGPU05RE).

Inmunoelectrotransferencia

Se concentraron 500 µl de sobrenadante de cultivo celular con dispositivos centrífugos Pall Nanosep Omega-Membrane 30KD (Pall, n.º de cat. OD030C33) hasta un volumen de 50 µl. Se diluyeron 17,5 µl de cada concentrado hasta un volumen final de 25 µl con tampón de muestra XT (Bio Rad, n.º de cat. 161-0791) 4x y agente reductor XT (BioRad, n.º de cat. 161-0792) 20x, se calentaron durante 8 minutos a 96 ºC y se aplicaron sobre un gel prefabricado Criterion XT al 4-12 % (n.º de cat. 345-0124). La transferencia se realizó con célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BioRad) a 20 V durante 30 minutos sobre una membrana de nitrocelulosa pura Trans-blot (0,45 µm) (BioRad, n.º de cat. 162-0117). El bloqueo de la membrana se realizó con reactivo de bloqueo de electrotransferencia (Roche, n.º de cat. 11921681001) 1x durante una hora a temperatura ambiente. La tinción se realizó con anticuerpos policlonales de conejo contra la cadena ligera κ humana conjugados con peroxidasa (DAKO, n.º de cat. P0129, diluido 1:3000) y conjugado de HRP con anticuerpos policlonales de conejo contra IgG humana (DAKO, n.º de cat. P0214, diluido 1:5000) durante una hora a temperatura ambiente. La detección de luminiscencia se llevó a cabo con LUMI-Imager F1 (Roche).

Purificación

Las células se extrajeron del medio de cultivo mediante centrifugación. Las proteínas multifuncionales se purificaron de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con proteína A (MabSelect-sefarosa sobre un sistema ÄKTA-Avant). Las proteínas multifuncionales eluidas se concentraron con tubos de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 3 mg/ml. Se analizó una alícuota en cromatografía de exclusión por tamaño (TSKgel GFC300 Sys89 de HPLC). Se realizó la SEC preparativa en una columna Superdex 200 para extraer los agregados y tamponar las proteínas de fusión en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las proteínas multifuncionales eluidas se concentraron con un tubo de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml y se filtraron de manera estéril (tamaño de poro de 0,2 µm).

Análisis

Las muestras de proteína multifuncional se analizaron mediante OD280 usando un espectrofotómetro UV para determinar la concentración de proteína en solución. El coeficiente de extinción requerido para esto se calculó a partir

de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace (Pace, *et al*., Protein Science 4 (1995) 2411-2423). La cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) se realizó en columnas TSK-Gel300SWXL o Superdex 200 con un tampón de fosfato de potasio 0,2 M, que comprende KCl 0,25 M, pH 7,0 como fase móvil con el fin de determinar el contenido de especies monoméricas, agregadas y degradadas en las muestras. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) (reductora y no reductora) se realizó para analizar la pureza de las preparaciones de proteína multifuncional con respecto a los productos de degradación relacionados con el producto y las impurezas no relacionadas. La espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) se realizó con muestras reducidas (TCEP) y desglucosiladas (N-glucosidasa F) para confirmar la masa/identidad correcta de cada cadena y detectar modificaciones químicas. La ESI-MS de las muestras desglucosiladas se llevó a cabo para analizar la naturaleza y la calidad de la proteína completamente ensamblada y detectar posibles productos secundarios relacionados con el producto.

Procedimiento SDS-PAGE y tinción de Coomassie

Dispositivo:	Minicélula XCell Sure Lock de Invitrogen
Gel:	Gel de tris-glicina al 4-20 %, Invitrogen EC6025BOX
Tampón:	Tampón de electroforesis de tris-glicina SDS (10x), Invitrogen LC2675-5
Tampón de muestra:	Tampón de muestra de tris-glicina SDS (2x), Invitrogen LC2676
Tampón reductor:	Agente reductor de muestras NuPAGE (10x), Invitrogen NP0004
Marcador de masa molecular:	Mark 12, estándar de PM, Invitrogen LC5677

Preparación de muestra de proteína

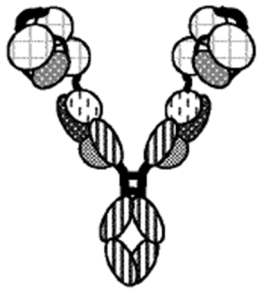
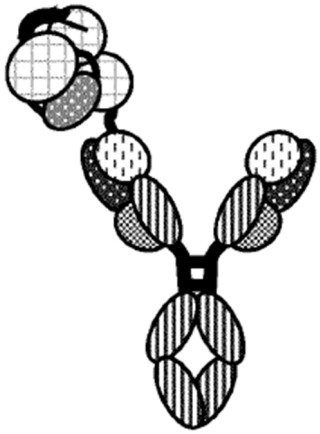
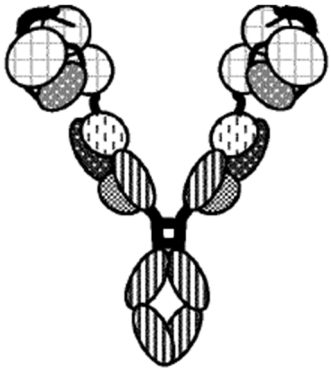
La muestra se ajustó hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml con tampón. Para la reducción de la muestra se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- tampón reductor: 4 ml de tampón de muestra (2x) y 1 ml de tampón reductor (10x)
- diluir la muestra 1:1 con tampón reductor
- incubar durante 5 minutos a 70 °C

La electroforesis en gel se llevó a cabo a 125 V durante 90 minutos. Los geles se tiñeron con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, n.º de cat. LC6065).

Resultados

Tabla.

N.º	polipéptidos comprendidos en la proteína multifuncional con especificidad de unión a MCSP	esquema	rendimiento
1	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal] 2. Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón) 3. Cadena ligera de Ig		2,2 mg/l
2	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A de IgG1] 2. Cadena ligera de Ig		< 1 µg/l
3	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector disulfuro]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A con disulfuro]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1 con variación de ojal] 2. Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón) 3. Cadena ligera de Ig		11,4 mg/l
4	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector disulfuro]-[microglobulina β2]-[conector 2]-[α1-α2-α3 de HLA-A con disulfuro]-[conector 3]-[mutantes L234A, L235A, P329G de IgG1] 2. Cadena ligera de Ig		> 20 mg/l

Se puede observar que se pueden obtener proteínas multifuncionales definidas.

Ejemplo 15

Activación de linfocitos T de complejos que comprenden un dominio presentador de antígeno en comparación con complejos que comprenden dos dominios presentadores de antígeno

Se estimularon veinte mil PBMC por pocillo en medio AIM-V (Gibco) a una concentración final de 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 µg/ml con construcciones de MHCI-0054 [aglutinante bivalente anti-MCSP con CMV-MHCI de un brazo, estabilizado con disulfuro] o MHCI-0065 [aglutinante bivalente anti-MCSP con CMV-MHCI de dos brazos, estabilizado con disulfuro] en un volumen de 150 µl de medio AIM-V durante 16 horas. Se combinaron PBMC de cuatro pocillos y se tiñeron con

1) anticuerpo anti-CD8 marcado con PE-Cy7 (BD n.º 557746) (5 µl/100 µl de PBS/FCS al 2 %), o
2) anticuerpo anti-CD4 marcado con FITC (BD n.º 555346) (20 µl/100 µl de PBS/FCS al 2 %), o
3) APC de CMV dextrámero (Immudex n.º WB2132) (10 µl/100 µl de PBS/FCS al 2 %), o
4) anticuerpo anti-CD25 marcado con PE (BioLegend n.º 302606) (5 µl/100 µl de PBS/FCS al 2 %), o
5) anticuerpo anti-CD69 marcado con PerCP/Cy5.5 (BioLegend n.º 310925) (5 µl/100 µl de PBS/FCS al 2 %)

en hielo durante 45 min, posteriormente se lava dos veces con PBS/FCS al 2 % (500 x g, 10 min).

Para determinar la activación de linfocitos T se usaron las siguientes lecturas:

1) frecuencia de células CD25+ de todas las células CD8+ específicas de CMV (NLVPMVATV pp65),
2) frecuencia de células CD69+ de las células CD8+ específicas de CMV (NLVPMVATV pp65), y
3) regulación por disminución del TCR cognado para el péptido NLVPMVATV pp65 de CMV (NLVPMVATV pp65) en el complejo MHC de clase I HLA A*0201 en células CD8+.

Resultados:

1) Regulación por incremento de CD25 en linfocitos T CD8 específicos de pp65 de CMV-HLA A*0201:

construcción	dosis aplicada	efecto
MHCI-0054	100 ng/ml	0,9 % CD25+
MHCI-0054	1 µg/ml	0,7 % CD25+
MHCI-0054	10 µg/ml	0,9 % CD25+
MHCI-0054	100 µg/ml	13,8 % CD25+
MHCI-0065	100 ng/ml	0,6 % CD25+
MHCI-0065	1 µg/ml	0,6 % CD25+
MHCI-0065	10 µg/ml	3,9 % CD25+
MHCI-0065	100 µg/ml	26,6 % CD25+

Por tanto, con 10 µg/ml y 100 µg/ml de MHCI-0065 se puede ver una regulación por incremento de la expresión de CD25 en comparación con MHCI-0054 (4,4 veces y 1,9 veces, respectivamente).

2) Regulación por incremento de CD69 en linfocitos T CD8 específicos de pp65 de CMV-HLA A*0201:

Por tanto, con 10 µg/ml y 100 µg/ml de MHCI-0065 se puede ver una regulación por incremento de la expresión de CD69 en comparación con MHCI-0054 (9,0 veces y 1,8 veces, respectivamente).

3) Regulación por disminución de TCR en linfocitos T CD8 específicos de pp65 de CMV-HLA A*0201:

construcción	dosis aplicada	efecto
MHCI-0054	100 ng/ml	0,6 % CD69+
MHCI-0054	1 µg/ml	0,9 % CD69+
MHCI-0054	10 µg/ml	2,3 % CD69+
MHCI-0054	100 µg/ml	36,8 % CD69+
MHCI-0065	100 ng/ml	1,3 % CD69+

MHCI-0065	1 µg/ml	2,3 % CD69+
MHCI-0065	10 µg/ml	20,6 % CD69+
MHCI-0065	100 µg/ml	67,1 % CD69+

Por tanto, con 10 µg/ml y 100 µg/ml de MHCI-0065 se puede observar una regulación por disminución de la expresión de TCR en comparación con MHCI-0054 (6,5 veces y 1,8 veces, respectivamente).

Por tanto, la activación de linfocitos T CD8 específicos de CMV es más fuerte con la fusión del anticuerpo homodímero bivalente que transporta dos complejos de MHC en comparación con la fusión del anticuerpo heterodímero bivalente que transporta solamente un único complejo de MHC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Proteínas multifuncionales que comprenden MHC de clase I multivalente unida por disulfuro

<130> 31397 WO

<150> EP12198904.0
<151> 21-12-2012

<150> EP13175469.9
<151> 08-07-2013

<160> 142

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 1

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 2

Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 3

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 4

Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 5

Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 6

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 7

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 8

Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 9

Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 10

Ala Val Gly Gly Ala Val Ala Ser Val
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 11

Thr Val Arg Ser His Cys Val Ser Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 12

Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 13

Gly Pro Ile Ser His Gly His Val Leu Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 14

Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 15

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu
1 5

<210> 16

<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 16

Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 17

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 18

Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 19

Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 20

Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val
1 5 10

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 21

Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 22

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 23

Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 24

Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 25

Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 26

Ala Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 27

Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 28

Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu
1 5

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 29

Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 30

Lys Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 31

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 32

Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 33

Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 34

Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 35

Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 36

Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 37

Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 38

Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 39

Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 40

Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 41

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 42

Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 43

His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu
1 5

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 44

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

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 45

Gln Met Trp Gln Ala Arg Leu Thr Val
1 5

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 46

His Glu Leu Leu Val Leu Val Lys Lys Ala Gln Leu
1 5 10

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 47

Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr Arg Tyr Val
1 5 10

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 48

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Herpesvirus humano 4

<400> 49

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

<400> 50

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 51

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus linfótropo de linfocitos T humano de tipo 1

<400> 52

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Homólogo del oncogén del virus de sarcoma V-jun 17 (JUN)

<400> 53

Phe Ala Glu Gly Phe Val Arg Ala Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Adenovirus humano de tipo 3

<400> 54

Leu Ile Val Ile Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 55

Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 56

Trp Tyr Ala Gln Ile Gln Pro His Trp
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 57

Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 58

Ile Leu Ile Gly Val Val Ile Thr Trp
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 59

Met Met Ile Pro Thr Val Val Ala Phe
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 60

Pro Phe Pro Gln Ser Asn Ala Pro Ile
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 61

Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Val
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 62

Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 63

Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asn Gly Val
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 64

Pro Leu Asn Glu Ala Ile Met Ala Val
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 65

Asn Leu Val Arg Leu Gln Ser Gly Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 66

Leu Val Ile Ser Gly Leu Phe Pro Val
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 67

Leu Leu Leu Val Ala His Tyr Ala Ile
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 68

Leu Ala Leu Leu Ala Ala Phe Lys Val
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 69

Val Ile Leu Ala Gly Pro Met Pro Val
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 70

His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
1 5

<210> 71
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15

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

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 72
<211> 274
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

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

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp

<210> 73
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 1

<400> 73

Gly Ser
1

<210> 74
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 2

<400> 74

Gly Gly Ser
1

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 3

<400> 75

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 4

<400> 76

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 5

<400> 77

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 6

<400> 78

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 79
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 7

<400> 79

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 80
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 8

<400> 80

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 9

<400> 81

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 10

<400> 82

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 83
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 11

<400> 83

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido conector 12

<400> 84

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1               5                   10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            20                  25
```

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    50                  55                  60

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
65                  70                  75                  80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                85                  90                  95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
            100                 105
```

<210> 86
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1               5                   10                  15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            20                  25                  30
```

```
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
        35                  40                  45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65                  70                  75                  80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            100                 105
```

<210> 87
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 88
<211> 232
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A

<400> 88

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205
```

```
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 89
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación de ojal

<400> 89

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175
```

```
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 90
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación de botón

<400> 90

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125
```

```
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 91
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y de ojal

<400> 91

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45
```

```
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 92
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y de botón

<400> 92

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 93
<211> 232

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G

<400> 93

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205
```

```
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 94
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y P329G

<400> 94

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175
```

```
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 95
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P239G y de ojal

<400> 95

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140
```

```
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 96
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P239G y de botón

<400> 96

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110
```

```
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 97
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y de ojal

<400> 97

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80
```

```
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 98
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y de botón

<400> 98

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45
```

```
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 99
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                   10                  15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

<210> 100
<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P y L235E

<400> 100

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

5 <210> 101

<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329G

<400> 101

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80
```

```
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

<210> 102
<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P y L235E

<400> 102

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

<210> 103
<211> 229
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329G

<400> 103

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205
```

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1

<400> 104

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L2

<400> 105

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L3

<400> 106

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H1

<400> 108

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 109
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H2

<400> 109

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H3

<400> 110

Phe Asp Tyr
1

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H1

<400> 111

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H2

<400> 112

```
Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 113
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de anticuerpo quimérico LC007

<400> 113

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro 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 Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 114
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de anticuerpo quimérico LC007

<400> 114

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 115
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de anticuerpo ML2 humanizado LC007

<400> 115

```
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 Gly 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 Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly 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 Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

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

<210> 116
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de anticuerpo M4-3 humanizado LC007

<400> 116

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 117
<211> 862
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-MHC-I-VH (MCSP)

<400> 117

```
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1               5                  10                  15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
            20                  25                  30

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

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
    50                  55                  60

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
                85                  90                  95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg
145                 150                 155                 160

Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
                165                 170                 175
```

```
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala
            180                 185                 190

Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg
        195                 200                 205

Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu
    210                 215                 220

Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg
225                 230                 235                 240

Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr
                245                 250                 255

His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp
            260                 265                 270

Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His
        275                 280                 285

Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
    290                 295                 300

Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala
                325                 330                 335

Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr
            340                 345                 350

Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
        355                 360                 365

Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
    370                 375                 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr
385                 390                 395                 400

Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg
                405                 410                 415
```

```
Trp Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
            420                 425                 430

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
        435                 440                 445

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
    450                 455                 460

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
465                 470                 475                 480

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
                485                 490                 495

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            500                 505                 510

Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
        515                 520                 525
```

```
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
    530                 535                 540

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
545                 550                 555                 560

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
                565                 570                 575

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
            580                 585                 590

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
        595                 600                 605

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
    610                 615                 620

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
625                 630                 635                 640

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
                645                 650                 655

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            660                 665                 670
```

```
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        675                 680                 685

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    690                 695                 700

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
705                 710                 715                 720

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                725                 730                 735

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            740                 745                 750

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        755                 760                 765

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
    770                 775                 780

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
785                 790                 795                 800

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                805                 810                 815

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            820                 825                 830

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        835                 840                 845

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    850                 855                 860
```

<210> 118
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366W de la región Fc de IgG1-VH (MCSP)

<400> 118

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255
```

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 119
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CL-VL (MCSP)

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly 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 Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly 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 Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 120
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 120

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 121
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1)

<400> 121

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Arg 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 Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 122

<211> 448

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de botón)

<400> 122

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Arg 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 Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 123
<211> 448

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal)

<400> 123

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Arg 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 Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 124
<211> 232
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc de la cadena pesada de Ig (región Fc de mutantes L234A, L235A de IgG1)

<400> 124

```
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220
```

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 125
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> scFv

<400> 125

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

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

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

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

```
Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
        195                 200                 205

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

Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Glu Ser Lys
                245
```

<210> 126
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-MCSP murino (kappa)

<400> 126

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro 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 Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 127
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-MCSP humanizado (kappa)

<400> 127

```
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 Gly 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 Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly 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 Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 128
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1)

<400> 128

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

```
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 129
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1)

<400> 129

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 130
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de botón)

<400> 130

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 131
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de botón)

<400> 131

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 132
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP murino (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de ojal)

<400> 132

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350
```

```
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 133
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-MCSP humanizado (mutantes L234A, L235A de IgG1 y variante de ojal)

<400> 133

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305                 310                 315                 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365
```

```
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 134
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-MCSP murino

<400> 134

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

```
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
    130                 135                 140

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

Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val
                165                 170                 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

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

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225                 230                 235
```

<210> 135
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-MCSP humanizado

<400> 135

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

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

```
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
145                 150                 155                 160

Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

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

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235
```

<210> 136
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 13

<400> 136

```
Gly Ser Gly
1
```

<210> 137
<211> 862
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-MHC-I-VH (MCSP) estabilizado con disulfuro

<400> 137

```
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1               5                  10                  15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
            20                  25                  30

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

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
    50                  55                  60

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
                85                  90                  95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg
145                 150                 155                 160

Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
                165                 170                 175
```

```
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala
            180                 185                 190

Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg
        195                 200                 205

Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu
    210                 215                 220

Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg
225                 230                 235                 240

Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr
                245                 250                 255
```

```
His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp
            260                 265                 270

Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His
        275                 280                 285

Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
    290                 295                 300

Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala
                325                 330                 335

Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr
            340                 345                 350

Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
        355                 360                 365

Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
    370                 375                 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr
385                 390                 395                 400

Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg
                405                 410                 415

Trp Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
            420                 425                 430
```

```
Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
        435                 440                 445

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
    450                 455                 460

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
465                 470                 475                 480

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
                485                 490                 495

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            500                 505                 510

Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
        515                 520                 525

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
    530                 535                 540

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
545                 550                 555                 560

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
                565                 570                 575

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
            580                 585                 590

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
        595                 600                 605

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
    610                 615                 620

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
625                 630                 635                 640

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
                645                 650                 655

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            660                 665                 670
```

```
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        675                 680                 685

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    690                 695                 700

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
705                 710                 715                 720

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                725                 730                 735

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            740                 745                 750

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
        755                 760                 765

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
    770                 775                 780

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
785                 790                 795                 800

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                805                 810                 815

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            820                 825                 830

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        835                 840                 845

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    850                 855                 860
```

<210> 138
<211> 2322
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

```
Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
1               5                  10                  15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
            20                  25                  30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
        35                  40                  45

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
                85                  90                  95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
            100                 105                 110

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
        115                 120                 125
```

```
Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
    130                 135                 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
                165                 170                 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
            180                 185                 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
        195                 200                 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
    210                 215                 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
225                 230                 235                 240

Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe
                245                 250                 255
```

```
Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu
            260                 265                 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser
        275                 280                 285

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro
    290                 295                 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
305                 310                 315                 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln
                325                 330                 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu
            340                 345                 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg
        355                 360                 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu
    370                 375                 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
385                 390                 395                 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
                405                 410                 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
            420                 425                 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
        435                 440                 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
    450                 455                 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
465                 470                 475                 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
                485                 490                 495
```

```
Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
            500                 505                 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
        515                 520                 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
    530                 535                 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
545                 550                 555                 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
                565                 570                 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
            580                 585                 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
        595                 600                 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
    610                 615                 620
```

```
Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
625                 630                 635                 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
                645                 650                 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
            660                 665                 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
        675                 680                 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
    690                 695                 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
705                 710                 715                 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
                725                 730                 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
            740                 745                 750
```

```
Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
        755                 760                 765

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
    770                 775                 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785                 790                 795                 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
                805                 810                 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
            820                 825                 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
        835                 840                 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
    850                 855                 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865                 870                 875                 880
```

```
Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
                885                 890                 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
            900                 905                 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
        915                 920                 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
    930                 935                 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945                 950                 955                 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
                965                 970                 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
            980                 985                 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp  Glu Glu Val Arg Gly  Val Phe Arg
        995                 1000                1005
```

```
Val Ala  Ile Gln Pro Val Asn  Asp His Ala Pro Val  Gln Thr Ile
    1010                1015                1020

Ser Arg  Ile Phe His Val Ala  Arg Gly Gly Arg Arg  Leu Leu Thr
    1025                1030                1035

Thr Asp  Asp Val Ala Phe Ser  Asp Ala Asp Ser Gly  Phe Ala Asp
    1040                1045                1050

Ala Gln  Leu Val Leu Thr Arg  Lys Asp Leu Leu Phe  Gly Ser Ile
    1055                1060                1065

Val Ala  Val Asp Glu Pro Thr  Arg Pro Ile Tyr Arg  Phe Thr Gln
    1070                1075                1080

Glu Asp  Leu Arg Lys Arg Arg  Val Leu Phe Val His  Ser Gly Ala
    1085                1090                1095

Asp Arg  Gly Trp Ile Gln Leu  Gln Val Ser Asp Gly  Gln His Gln
    1100                1105                1110

Ala Thr  Ala Leu Leu Glu Val  Gln Ala Ser Glu Pro  Tyr Leu Arg
    1115                1120                1125
```

```
Val Ala  Asn Gly Ser Ser Leu  Val Val Pro Gln Gly  Gly Gln Gly
    1130                 1135                 1140

Thr Ile  Asp Thr Ala Val Leu  His Leu Asp Thr Asn  Leu Asp Ile
    1145                 1150                 1155

Arg Ser  Gly Asp Glu Val His  Tyr His Val Thr Ala  Gly Pro Arg
    1160                 1165                 1170

Trp Gly  Gln Leu Val Arg Ala  Gly Gln Pro Ala Thr  Ala Phe Ser
    1175                 1180                 1185

Gln Gln  Asp Leu Leu Asp Gly  Ala Val Leu Tyr Ser  His Asn Gly
    1190                 1195                 1200

Ser Leu  Ser Pro Arg Asp Thr  Met Ala Phe Ser Val  Glu Ala Gly
    1205                 1210                 1215

Pro Val  His Thr Asp Ala Thr  Leu Gln Val Thr Ile  Ala Leu Glu
    1220                 1225                 1230

Gly Pro  Leu Ala Pro Leu Lys  Leu Val Arg His Lys  Lys Ile Tyr
    1235                 1240                 1245
```

```
Val Phe  Gln Gly Glu Ala Ala  Glu Ile Arg Arg Asp  Gln Leu Glu
    1250                 1255                 1260

Ala Ala  Gln Glu Ala Val Pro  Pro Ala Asp Ile Val  Phe Ser Val
    1265                 1270                 1275

Lys Ser  Pro Pro Ser Ala Gly  Tyr Leu Val Met Val  Ser Arg Gly
    1280                 1285                 1290

Ala Leu  Ala Asp Glu Pro Pro  Ser Leu Asp Pro Val  Gln Ser Phe
    1295                 1300                 1305

Ser Gln  Glu Ala Val Asp Thr  Gly Arg Val Leu Tyr  Leu His Ser
    1310                 1315                 1320

Arg Pro  Glu Ala Trp Ser Asp  Ala Phe Ser Leu Asp  Val Ala Ser
    1325                 1330                 1335

Gly Leu  Gly Ala Pro Leu Glu  Gly Val Leu Val Glu  Leu Glu Val
    1340                 1345                 1350

Leu Pro  Ala Ala Ile Pro Leu  Glu Ala Gln Asn Phe  Ser Val Pro
    1355                 1360                 1365
```

```
Glu Gly  Gly Ser Leu Thr Leu  Ala Pro Pro Leu Leu  Arg Val Ser
    1370                 1375                 1380

Gly Pro  Tyr Phe Pro Thr Leu  Leu Gly Leu Ser Leu  Gln Val Leu
    1385                 1390                 1395

Glu Pro  Pro Gln His Gly Ala  Leu Gln Lys Glu Asp  Gly Pro Gln
    1400                 1405                 1410

Ala Arg  Thr Leu Ser Ala Phe  Ser Trp Arg Met Val  Glu Glu Gln
    1415                 1420                 1425

Leu Ile  Arg Tyr Val His Asp  Gly Ser Glu Thr Leu  Thr Asp Ser
    1430                 1435                 1440

Phe Val  Leu Met Ala Asn Ala  Ser Glu Met Asp Arg  Gln Ser His
    1445                 1450                 1455

Pro Val  Ala Phe Thr Val Thr  Val Leu Pro Val Asn  Asp Gln Pro
    1460                 1465                 1470

Pro Ile  Leu Thr Thr Asn Thr  Gly Leu Gln Met Trp  Glu Gly Ala
    1475                 1480                 1485

Thr Ala  Pro Ile Pro Ala Glu  Ala Leu Arg Ser Thr  Asp Gly Asp
    1490                 1495                 1500

Ser Gly  Ser Glu Asp Leu Val  Tyr Thr Ile Glu Gln  Pro Ser Asn
    1505                 1510                 1515

Gly Arg  Val Val Leu Arg Gly  Ala Pro Gly Thr Glu  Val Arg Ser
    1520                 1525                 1530

Phe Thr  Gln Ala Gln Leu Asp  Gly Gly Leu Val Leu  Phe Ser His
    1535                 1540                 1545

Arg Gly  Thr Leu Asp Gly Gly  Phe Arg Phe Arg Leu  Ser Asp Gly
    1550                 1555                 1560

Glu His  Thr Ser Pro Gly His  Phe Phe Arg Val Thr  Ala Gln Lys
    1565                 1570                 1575

Gln Val  Leu Leu Ser Leu Lys  Gly Ser Gln Thr Leu  Thr Val Cys
    1580                 1585                 1590
```

```
Pro Gly  Ser Val Gln Pro Leu  Ser Ser Gln Thr Leu  Arg Ala Ser
    1595                 1600                 1605

Ser Ser  Ala Gly Thr Asp Pro  Gln Leu Leu Leu Tyr  Arg Val Val
    1610                 1615                 1620

Arg Gly  Pro Gln Leu Gly Arg  Leu Phe His Ala Gln  Gln Asp Ser
    1625                 1630                 1635

Thr Gly  Glu Ala Leu Val Asn  Phe Thr Gln Ala Glu  Val Tyr Ala
    1640                 1645                 1650

Gly Asn  Ile Leu Tyr Glu His  Glu Met Pro Pro Glu  Pro Phe Trp
    1655                 1660                 1665

Glu Ala  His Asp Thr Leu Glu  Leu Gln Leu Ser Ser  Pro Pro Ala
    1670                 1675                 1680

Arg Asp  Val Ala Ala Thr Leu  Ala Val Ala Val Ser  Phe Glu Ala
    1685                 1690                 1695

Ala Cys  Pro Gln Arg Pro Ser  His Leu Trp Lys Asn  Lys Gly Leu
    1700                 1705                 1710

Trp Val  Pro Glu Gly Gln Arg  Ala Arg Ile Thr Val  Ala Ala Leu
    1715                 1720                 1725

Asp Ala  Ser Asn Leu Leu Ala  Ser Val Pro Ser Pro  Gln Arg Ser
    1730                 1735                 1740

Glu His  Asp Val Leu Phe Gln  Val Thr Gln Phe Pro  Ser Arg Gly
    1745                 1750                 1755

Gln Leu  Leu Val Ser Glu Glu  Pro Leu His Ala Gly  Gln Pro His
    1760                 1765                 1770

Phe Leu  Gln Ser Gln Leu Ala  Ala Gly Gln Leu Val  Tyr Ala His
    1775                 1780                 1785

Gly Gly  Gly Gly Thr Gln Gln  Asp Gly Phe His Phe  Arg Ala His
    1790                 1795                 1800

Leu Gln  Gly Pro Ala Gly Ala  Ser Val Ala Gly Pro  Gln Thr Ser
    1805                 1810                 1815

Glu Ala  Phe Ala Ile Thr Val  Arg Asp Val Asn Glu  Arg Pro Pro
    1820                 1825                 1830
```

```
Gln Pro  Gln Ala Ser Val Pro  Leu Arg Leu Thr Arg  Gly Ser Arg
    1835                 1840                 1845

Ala Pro  Ile Ser Arg Ala Gln  Leu Ser Val Val Asp  Pro Asp Ser
    1850                 1855                 1860

Ala Pro  Gly Glu Ile Glu Tyr  Glu Val Gln Arg Ala  Pro His Asn
    1865                 1870                 1875

Gly Phe  Leu Ser Leu Val Gly  Gly Gly Leu Gly Pro  Val Thr Arg
    1880                 1885                 1890

Phe Thr  Gln Ala Asp Val Asp  Ser Gly Arg Leu Ala  Phe Val Ala
    1895                 1900                 1905

Asn Gly  Ser Ser Val Ala Gly  Ile Phe Gln Leu Ser  Met Ser Asp
    1910                 1915                 1920

Gly Ala  Ser Pro Pro Leu Pro  Met Ser Leu Ala Val  Asp Ile Leu
    1925                 1930                 1935

Pro Ser  Ala Ile Glu Val Gln  Leu Arg Ala Pro Leu  Glu Val Pro
    1940                 1945                 1950

Gln Ala  Leu Gly Arg Ser Ser  Leu Ser Gln Gln Gln  Leu Arg Val
    1955                 1960                 1965

Val Ser  Asp Arg Glu Glu Pro  Glu Ala Ala Tyr Arg  Leu Ile Gln
    1970                 1975                 1980

Gly Pro  Gln Tyr Gly His Leu  Leu Val Gly Gly Arg  Pro Thr Ser
    1985                 1990                 1995

Ala Phe  Ser Gln Phe Gln Ile  Asp Gln Gly Glu Val  Val Phe Ala
    2000                 2005                 2010

Phe Thr  Asn Phe Ser Ser Ser  His Asp His Phe Arg  Val Leu Ala
    2015                 2020                 2025
```

```
Leu Ala  Arg Gly Val Asn Ala  Ser Ala Val Val Asn  Val Thr Val
    2030                 2035                 2040

Arg Ala  Leu Leu His Val Trp  Ala Gly Gly Pro Trp  Pro Gln Gly
    2045                 2050                 2055

Ala Thr  Leu Arg Leu Asp Pro  Thr Val Leu Asp Ala  Gly Glu Leu
    2060                 2065                 2070

Ala Asn  Arg Thr Gly Ser Val  Pro Arg Phe Arg Leu  Leu Glu Gly
    2075                 2080                 2085

Pro Arg  His Gly Arg Val Val  Arg Val Pro Arg Ala  Arg Thr Glu
    2090                 2095                 2100

Pro Gly  Gly Ser Gln Leu Val  Glu Gln Phe Thr Gln  Gln Asp Leu
    2105                 2110                 2115

Glu Asp  Gly Arg Leu Gly Leu  Glu Val Gly Arg Pro  Glu Gly Arg
    2120                 2125                 2130

Ala Pro  Gly Pro Ala Gly Asp  Ser Leu Thr Leu Glu  Leu Trp Ala
    2135                 2140                 2145

Gln Gly  Val Pro Pro Ala Val  Ala Ser Leu Asp Phe  Ala Thr Glu
    2150                 2155                 2160

Pro Tyr  Asn Ala Ala Arg Pro  Tyr Ser Val Ala Leu  Leu Ser Val
    2165                 2170                 2175

Pro Glu  Ala Ala Arg Thr Glu  Ala Gly Lys Pro Glu  Ser Ser Thr
    2180                 2185                 2190

Pro Thr  Gly Glu Pro Gly Pro  Met Ala Ser Ser Pro  Glu Pro Ala
    2195                 2200                 2205
```

```
Val Ala  Lys Gly Gly Phe Leu  Ser Phe Leu Glu Ala  Asn Met Phe
    2210                 2215                 2220

Ser Val  Ile Ile Pro Met Cys  Leu Val Leu Leu Leu  Leu Ala Leu
    2225                 2230                 2235

Ile Leu  Pro Leu Leu Phe Tyr  Leu Arg Lys Arg Asn  Lys Thr Gly
    2240                 2245                 2250

Lys His  Asp Val Gln Val Leu  Thr Ala Lys Pro Arg  Asn Gly Leu
    2255                 2260                 2265

Ala Gly  Asp Thr Glu Thr Phe  Arg Lys Val Glu Pro  Gly Gln Ala
    2270                 2275                 2280

Ile Pro  Leu Thr Ala Val Pro  Gly Gln Gly Pro Pro  Pro Gly Gly
    2285                 2290                 2295

Gln Pro  Asp Pro Glu Leu Leu  Gln Phe Cys Arg Thr  Pro Asn Pro
    2300                 2305                 2310

Ala Leu  Lys Asn Gly Gln Tyr  Trp Val
    2315                 2320
```

<210> 139
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> conector para proteínas multifuncionales unidas por disulfuro

<400> 139

```
Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1               5                  10                  15
```

<210> 140
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> a1-a3 de HLA-A*0201 para proteína multifuncional unida por disulfuro

<400> 140

```
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1               5                  10                  15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
            20                  25                  30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
        35                  40                  45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
    50                  55                  60

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

Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
                85                  90                  95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
            100                 105                 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
        115                 120                 125
```

```
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
    130                 135                 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
            180                 185                 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
        195                 200                 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
    210                 215                 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225                 230                 235                 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
                245                 250                 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
            260                 265                 270

Arg Trp
```

<210> 141
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V de la región Fc de IgG1-VH (MCSP)

<400> 141

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
```

```
Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255
```

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 142
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de los mutantes L234A, L235A, P329G, T366W de la región Fc de IgG1-VH (MCSP)

<400> 142

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
            180                 185                 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

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

```
Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro, caracterizada por que comprende

- uno o dos dominios presentadores de antígeno,
- una región Fc de anticuerpo, y
- uno o más sitios de unión a antígeno,

en la que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

bien

(i) una microglobulina β_2, y

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %,

o

(i) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 %, y

(ii) una microglobulina β_2,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2, y

(iii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

o

(i) un péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T,

(ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más, y

(iii) una microglobulina β_2,

en la que el sitio de unión a antígeno se une a un antígeno de superficie de células cancerosas,

en la que el dominio presentador de antígeno tiene al menos dos residuos de cisteína no naturales que forman un enlace disulfuro intracatenario/interdominio.

2. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que un residuo de cisteína no natural en el dominio presentador de antígeno está en el conector entre el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína no natural está en uno de los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de la molécula de MHC de clase I.

3. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que

el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro, o

el dominio presentador de antígeno tiene residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 108, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 108 forman un enlace disulfuro.

4. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la región Fc de anticuerpo comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc, que están unidos entre sí por disulfuro, por medio de lo

cual el sitio de unión a antígeno o uno de los sitios de unión a antígeno comprende el primer polipéptido de la región Fc y el segundo sitio de unión a antígeno, si está presente, comprende el segundo polipéptido de la región Fc.

5. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el sitio de unión a antígeno comprende i) un par de una cadena pesada de un anticuerpo y una cadena ligera de un anticuerpo, o ii) un polipéptido de fusión scFv que comprende en la dirección N a C terminal un fragmento de anticuerpo scFv y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo, o iii) un polipéptido de fusión scFab que comprende en la dirección N a C terminal un scFab y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo.

o

los sitios de unión a antígeno comprenden independientemente unos de otros i) un par (cognado) de una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, por medio de lo cual las cadenas individuales pueden ser cadenas naturales o cadenas modificadas (sustituidas, mutadas o con intercambio de dominios), o ii) un polipéptido de fusión scFv que comprende en la dirección N a C terminal un fragmento de anticuerpo scFv y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo, o iii) un polipéptido de fusión scFab que comprende en la dirección N a C terminal un scFab y un polipéptido de la región Fc de anticuerpo.

6. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que i) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N de la cadena pesada o al extremo N de la cadena ligera de un sitio de unión a antígeno, o ii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N de la cadena pesada o a cada extremo N de la cadena ligera de cada sitio de unión a antígeno, o iii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo C de la cadena pesada o al extremo C de la cadena ligera del sitio de unión a antígeno, o iv) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo C de la cadena pesada o a cada extremo C de la cadena ligera de cada sitio de unión a antígeno, o v) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFv, o vi) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFv, o vii) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C de un polipéptido de fusión scFab, o viii) un dominio presentador de antígeno se une a cada extremo N o C de cada polipéptido de fusión scFab, o ix) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc, o x) un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del primer polipéptido de la región Fc y un dominio presentador de antígeno se une al extremo N o C del segundo polipéptido de la región Fc.

7. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que el péptido que provoca una respuesta de los linfocitos T es un péptido derivado del citomegalovirus humano.

8. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el péptido derivado de virus tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01.

9. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-C*0304, HLA-C*0401 y HLA-C*0702.

10. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % se selecciona del grupo que comprende HLA-B*4201, HLA-B*5901, HLA-B*6701 y HLA-B*7802.

11. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que el dominio presentador de antígeno comprende

(i) un péptido derivado de virus,

(ii) microglobulina β_2,

(iii) el alelo soluble de HLA-A A*0201 y

(iv) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227 forman un enlace disulfuro.

12. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que el dominio presentador de antígeno comprende en la dirección N a C terminal

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 70,

(ii) un primer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 139,

(iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71,

(iv) un segundo péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 77, 78, 79, 82, 83 y 84,

(v) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140,

(vi) un tercer péptido conector que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 73, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 136, y

(vii) residuos de cisteína al menos en la posición 11 y en la posición 227, y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 11 y la posición 227.

13. Una formulación farmacéutica que comprende la proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso como medicamento.

15. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento del cáncer.

16. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la atracción de linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.

17. La proteína multifuncional multivalente unida por disulfuro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la supresión de células cancerosas o de células infectadas por un virus.

Figura 1

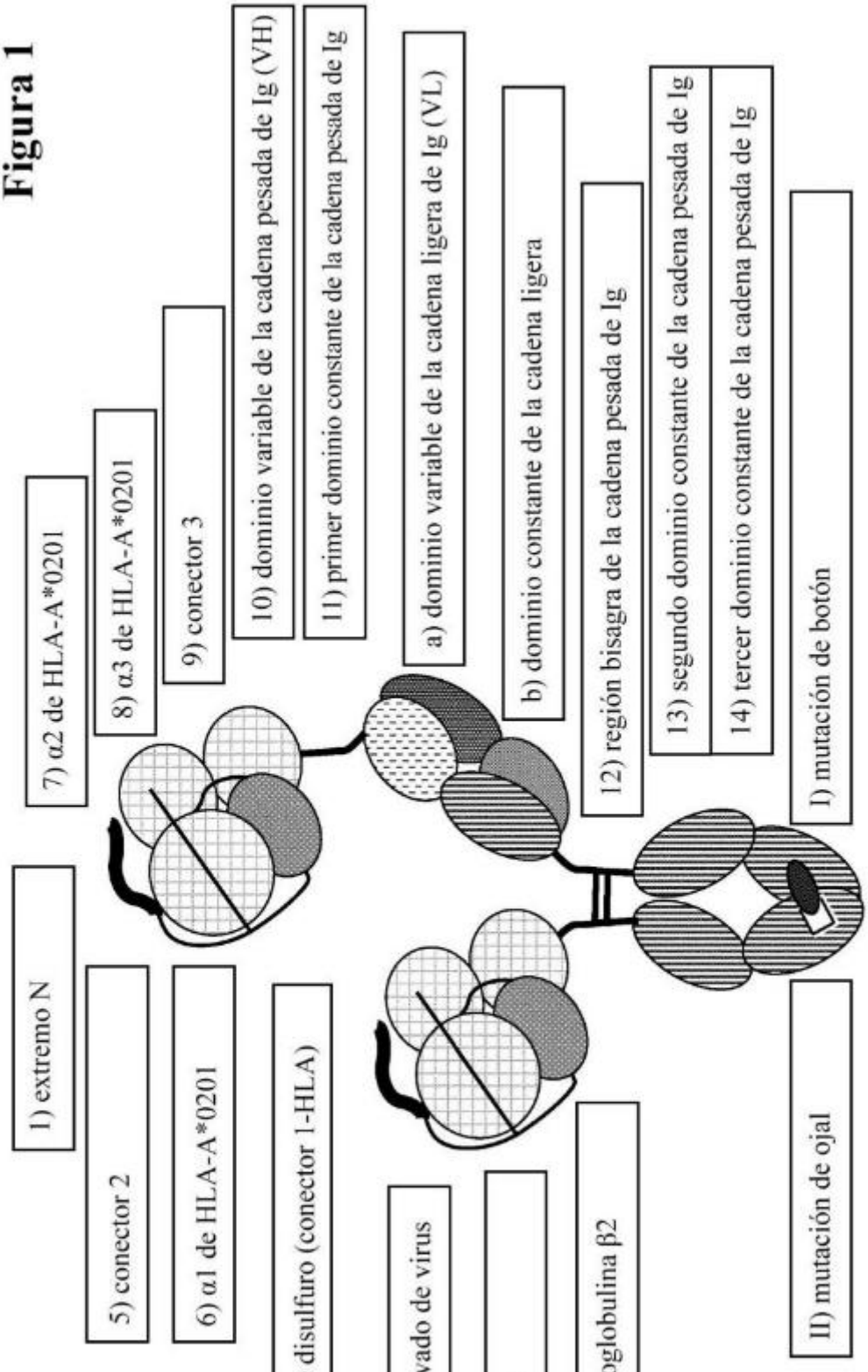

1) extremo N
5) conector 2
6) α1 de HLA-A*0201
3-6) enlace disulfuro (conector 1-HLA)
2) péptido derivado de virus
3) conector 1
4) microglobulina β2
7) α2 de HLA-A*0201
8) α3 de HLA-A*0201
9) conector 3
10) dominio variable de la cadena pesada de Ig (VH)
11) primer dominio constante de la cadena pesada de Ig
a) dominio variable de la cadena ligera de Ig (VL)
b) dominio constante de la cadena ligera
12) región bisagra de la cadena pesada de Ig
13) segundo dominio constante de la cadena pesada de Ig
14) tercer dominio constante de la cadena pesada de Ig
I) mutación de botón
II) mutación de ojal

Figura 2

péptido señal
péptido derivado de virus
microglobulina ß2
α1-α2-α3 de MHCI
cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
péptido señal
microglobulina ß2
α1-α2-α3 de MHCI
cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
péptido señal
péptido derivado de virus
α1-α2-α3 de MHCI
microglobulina ß2
cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
péptido señal
α1-α2-α3 de MHCI
microglobulina ß2
cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido

Figura 3

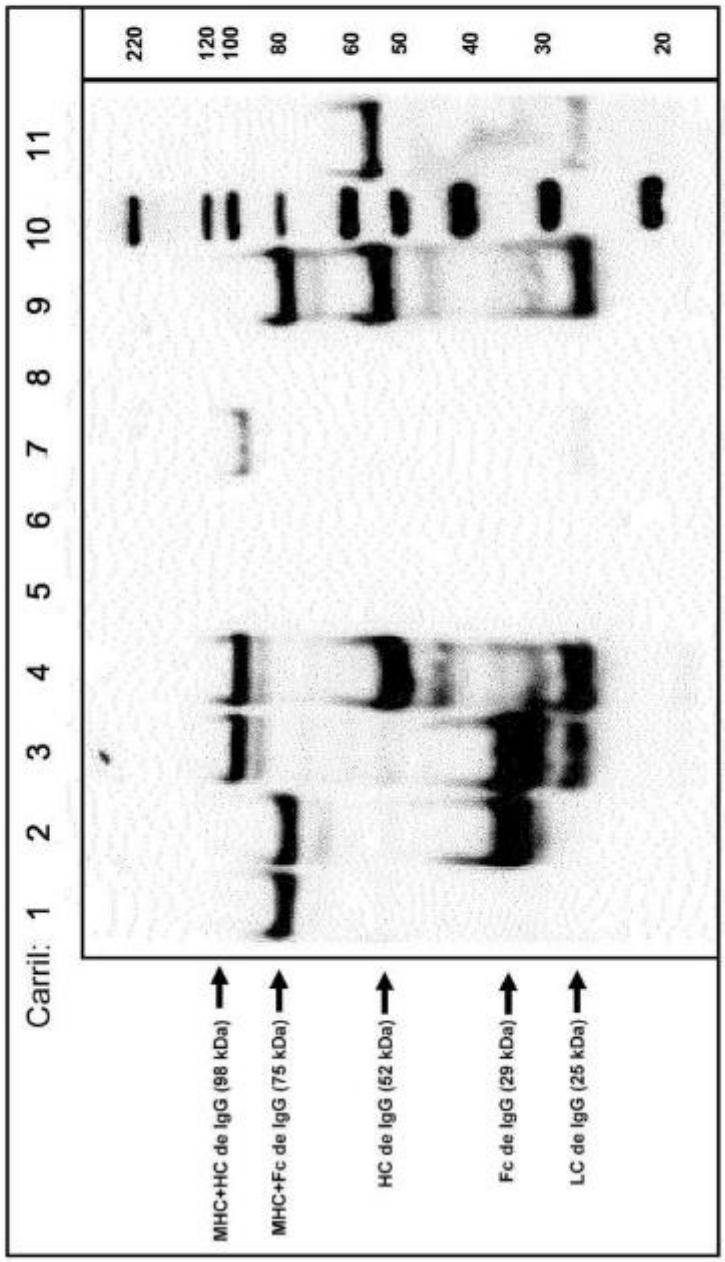

Carril: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
220
120
100
80
60
50
40
30
20
MHC+HC de IgG (98 kDa)
MHC+Fc de IgG (75 kDa)
HC de IgG (52 kDa)
Fc de IgG (29 kDa)
LC de IgG (25 kDa)

Figura 4A

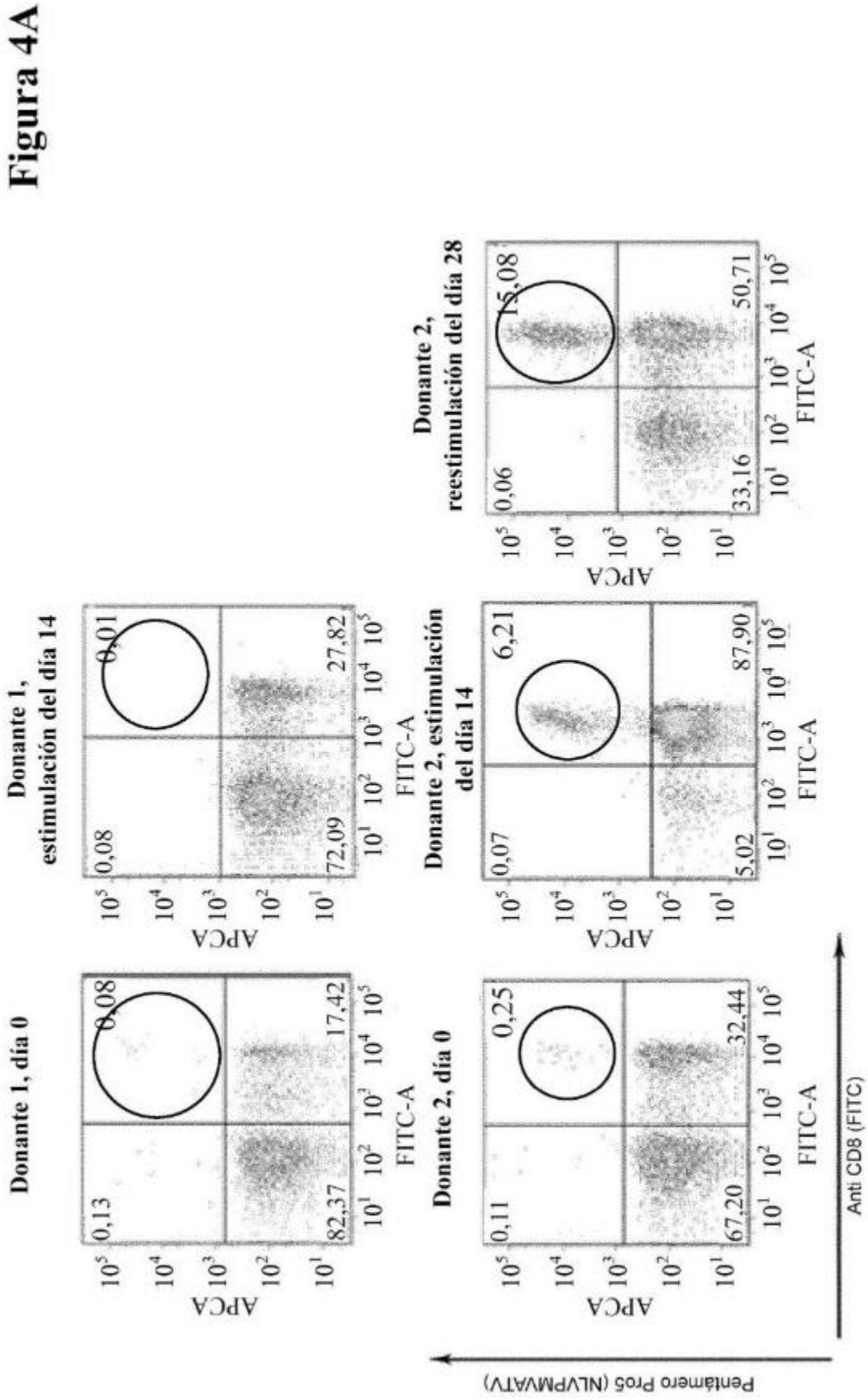

Donante 1, día 0
Donante 1, estimulación del día 14
Donante 2, día 0
Donante 2, estimulación del día 14
Donante 2, reestimulación del día 28
APCA
FITC-A
Pentámero Pro5 (NLVPMVATV)
Anti CD8 (FITC)
0,13
8,08
82,37
17,42
0,08
0,01
72,09
27,82
0,11
0,25
67,20
32,44
0,07
6,21
5,02
87,90
0,06
15,08
33,16
50,71

Figura 4B

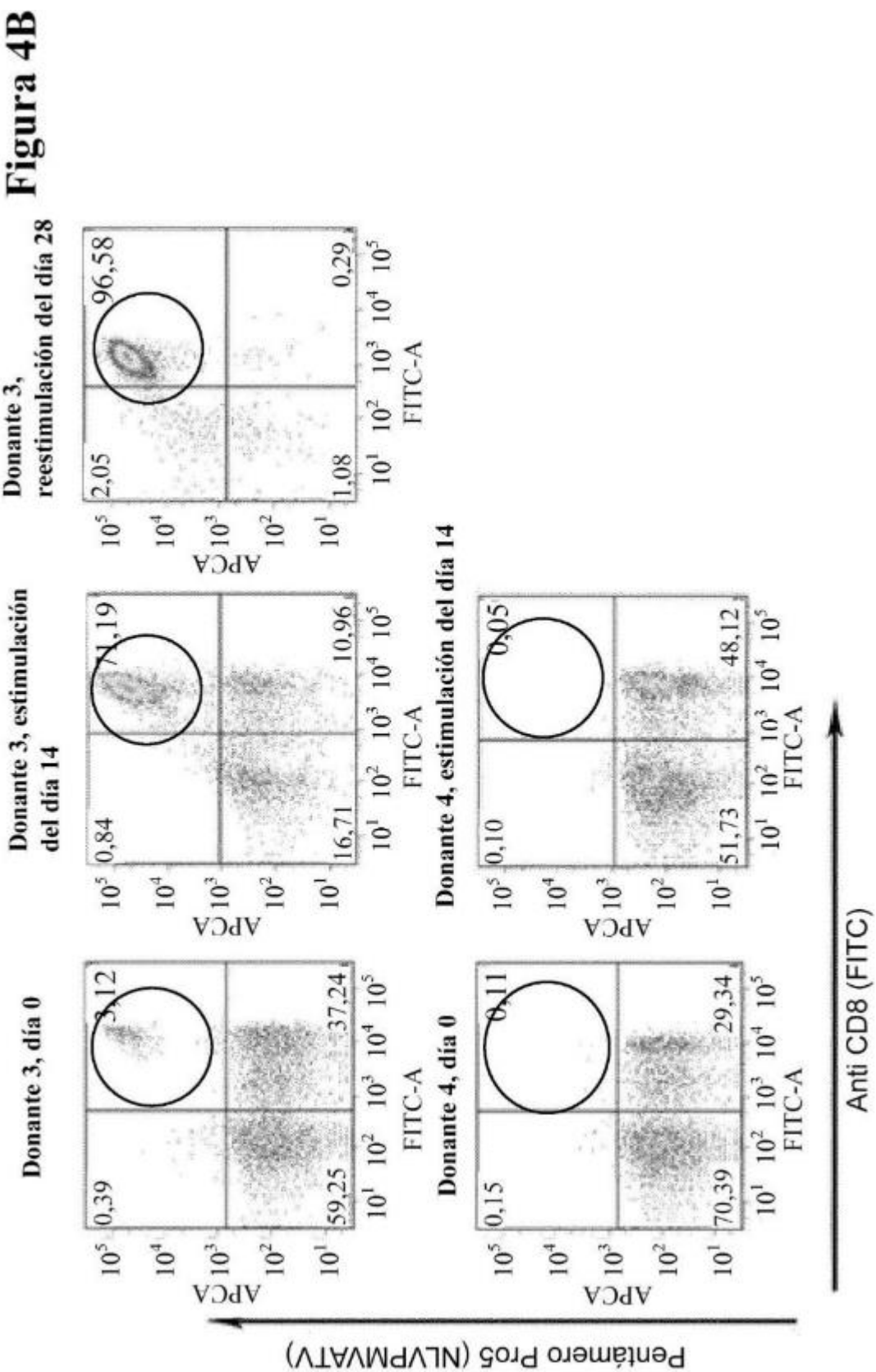

Donante 3, día 0
Donante 3, estimulación del día 14
Donante 3, reestimulación del día 28
Donante 4, día 0
Donante 4, estimulación del día 14
0,39
3,12
59,25
37,24
0,84
71,19
16,71
10,96
2,05
96,58
1,08
0,29
0,15
0,11
70,39
29,34
0,10
0,05
51,73
48,12
APCA
FITC-A
Pentámero Pro5 (NLVPMVATV)
Anti CD8 (FITC)

Figura 5

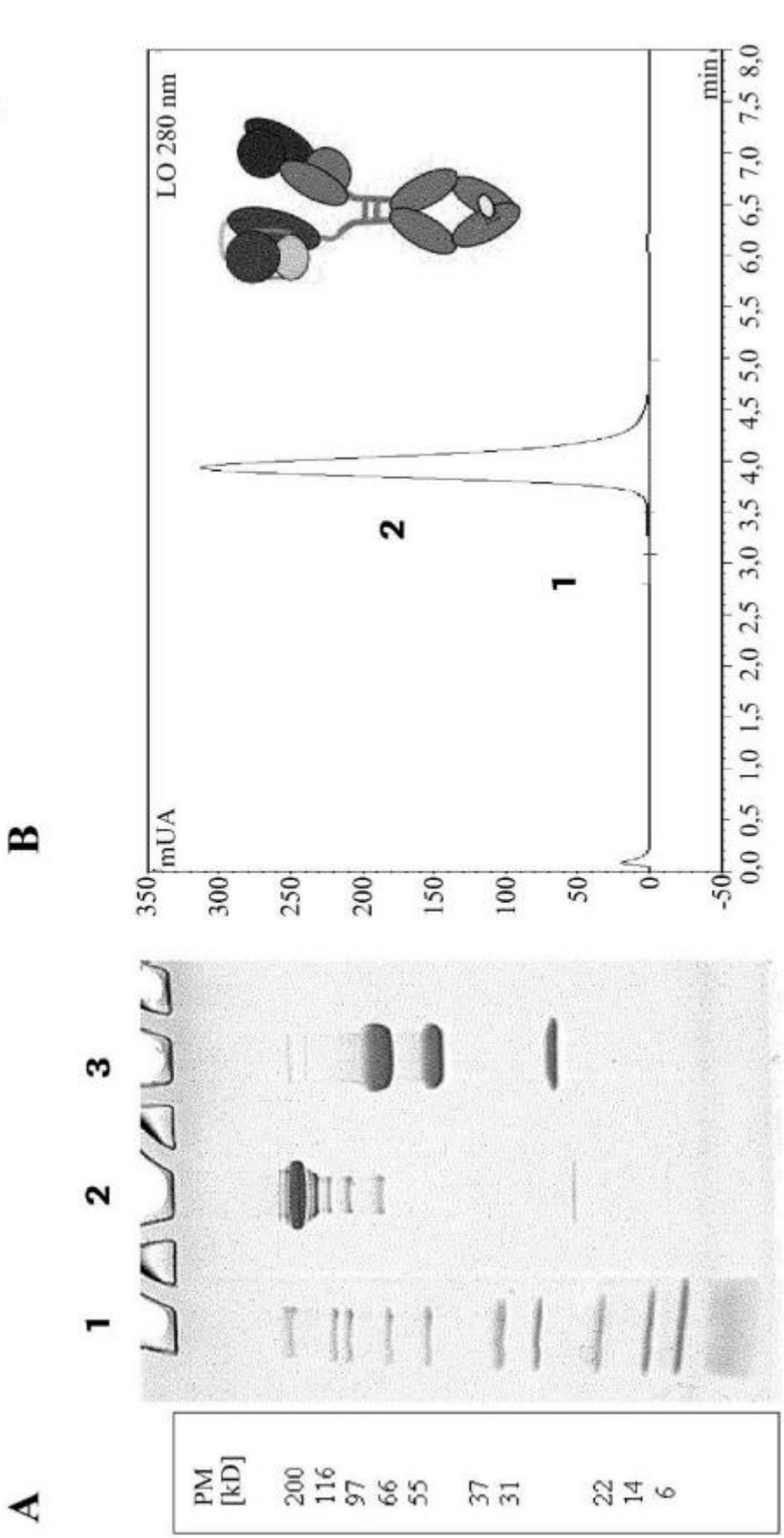

A
1
2
3
PM [kD]
200
116
97
66
55
37
31
22
14
6
B
LO 280 nm
mUA
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
1
2
min
0,0 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 5,0 5,5 6,0 6,5 7,0 7,5 8,0

Figura 6A

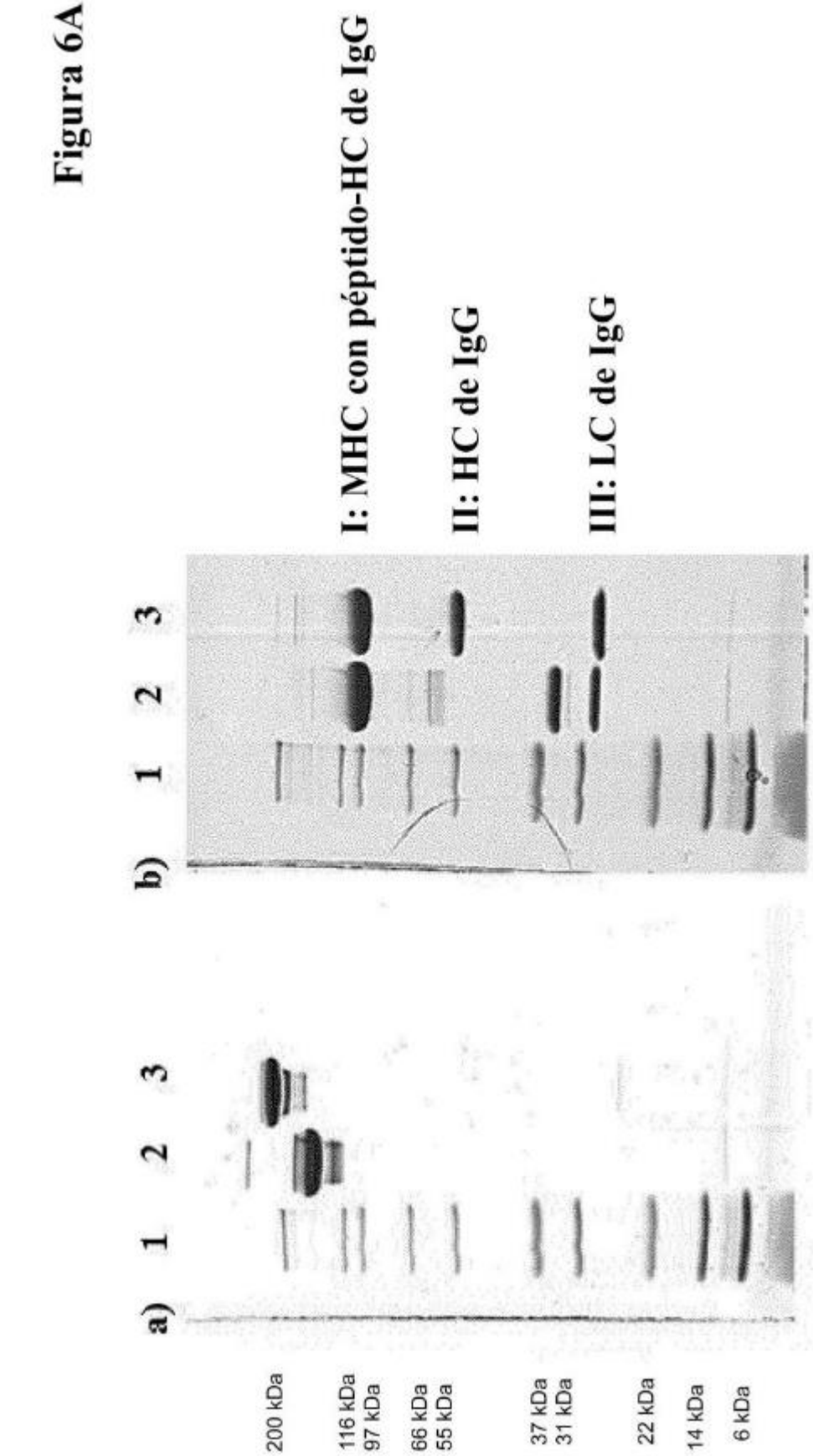

a)
1
2
3
200 kDa
116 kDa
97 kDa
66 kDa
55 kDa
37 kDa
31 kDa
22 kDa
14 kDa
6 kDa
b)
1
2
3
I: MHC con péptido-HC de IgG
II: HC de IgG
III: LC de IgG

Figura 6B

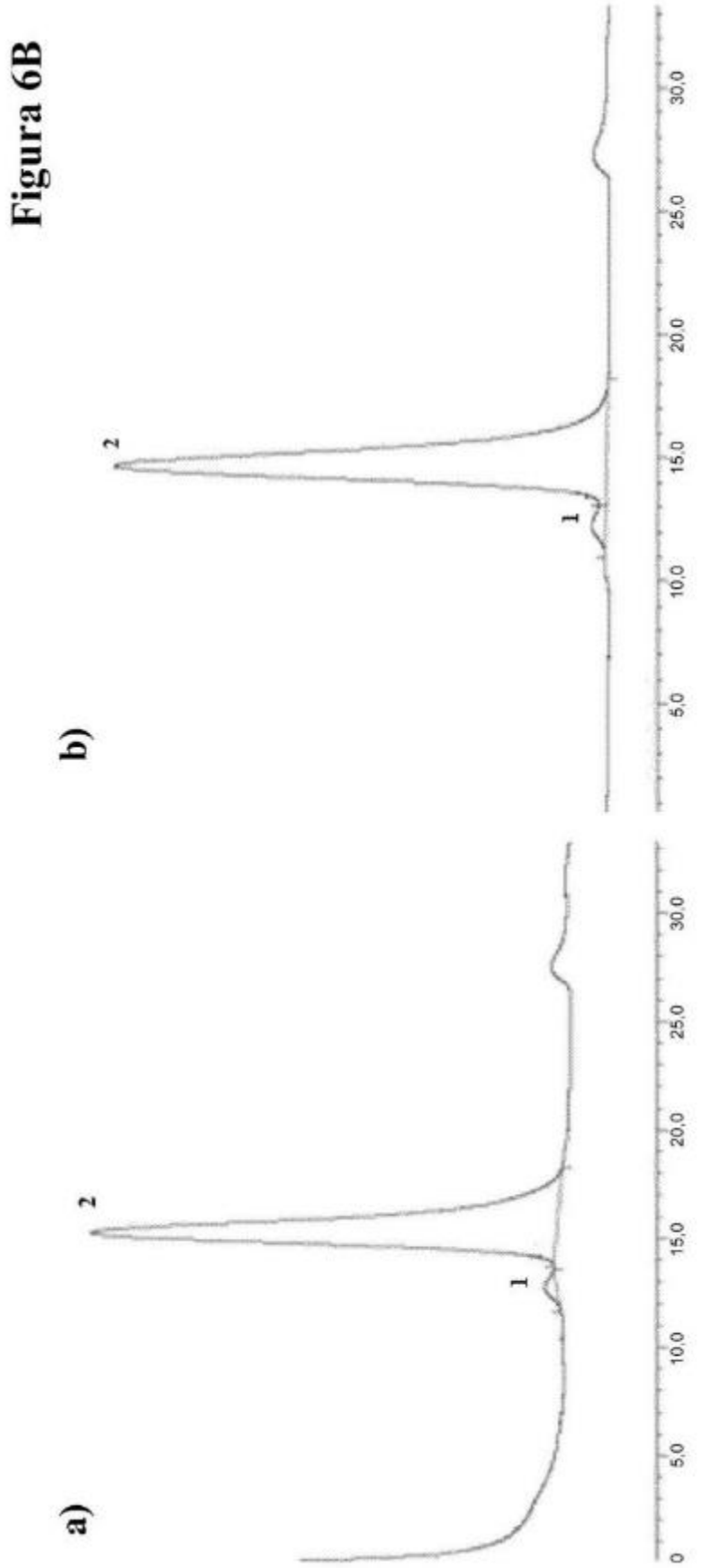


Figura 6C

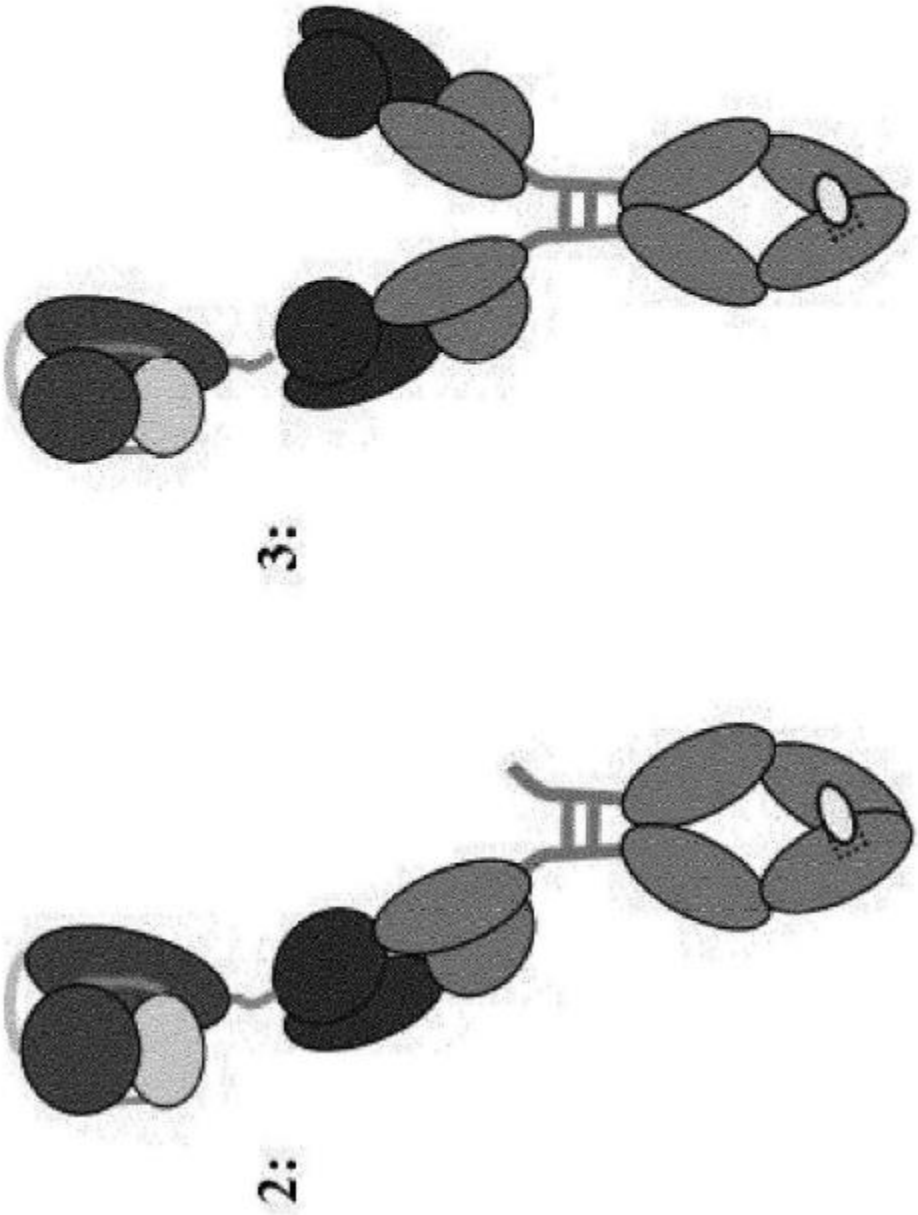


Figura 7

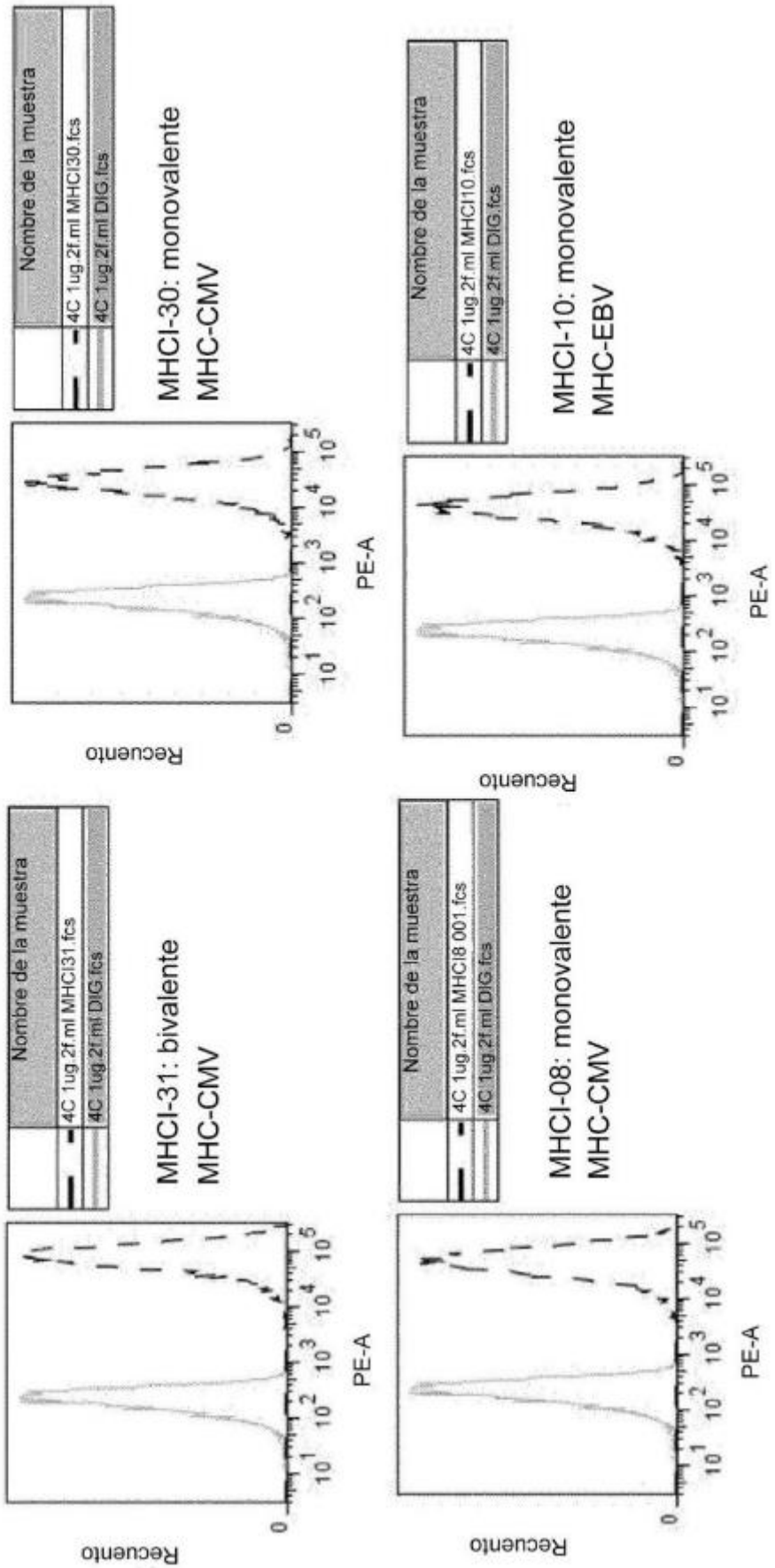
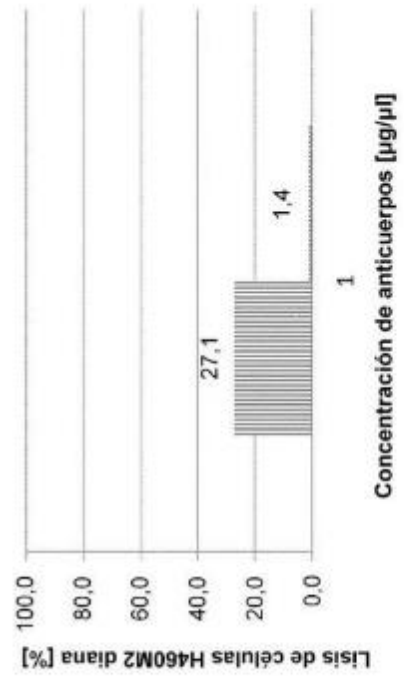
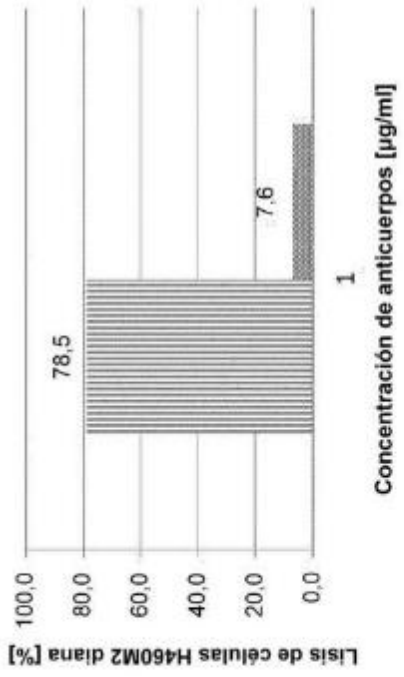

Nombre de la muestra
4C 1ug.2f.ml MHCI30.fcs
4C 1ug.2f.ml DIG.fcs
MHCI-30: monovalente
MHC-CMV
Nombre de la muestra
4C 1ug.2f.ml MHCI31.fcs
4C 1ug.2f.ml DIG.fcs
MHCI-31: bivalente
MHC-CMV
Nombre de la muestra
4C 1ug.2f.ml MHCI10.fcs
4C 1ug.2f.ml DIG.fcs
MHCI-10: monovalente
MHC-EBV
Nombre de la muestra
4C 1ug.2f.ml MHCI8 001.fcs
4C 1ug.2f.ml DIG.fcs
MHCI-08: monovalente
MHC-CMV
Recuento
PE-A
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

Figura 8


c)
Lisis de células H460M2 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
27,1
1,4
1
Concentración de anticuerpos [µg/µl]


a)
Lisis de células H460M2 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
78,5
7,6
1
Concentración de anticuerpos [µg/ml]

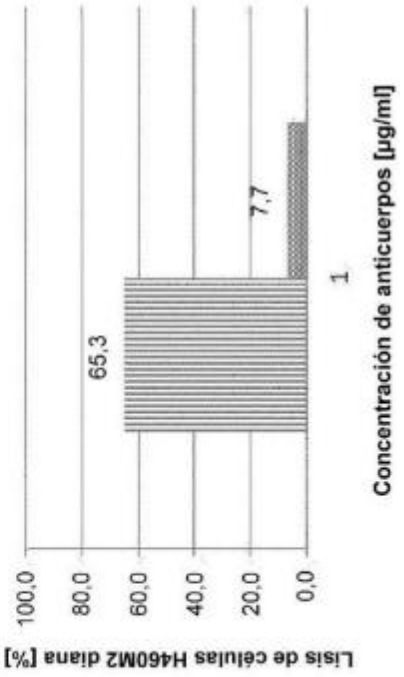

b)
Lisis de células H460M2 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
65,3
7,7
1
Concentración de anticuerpos [µg/ml]

Figura 9

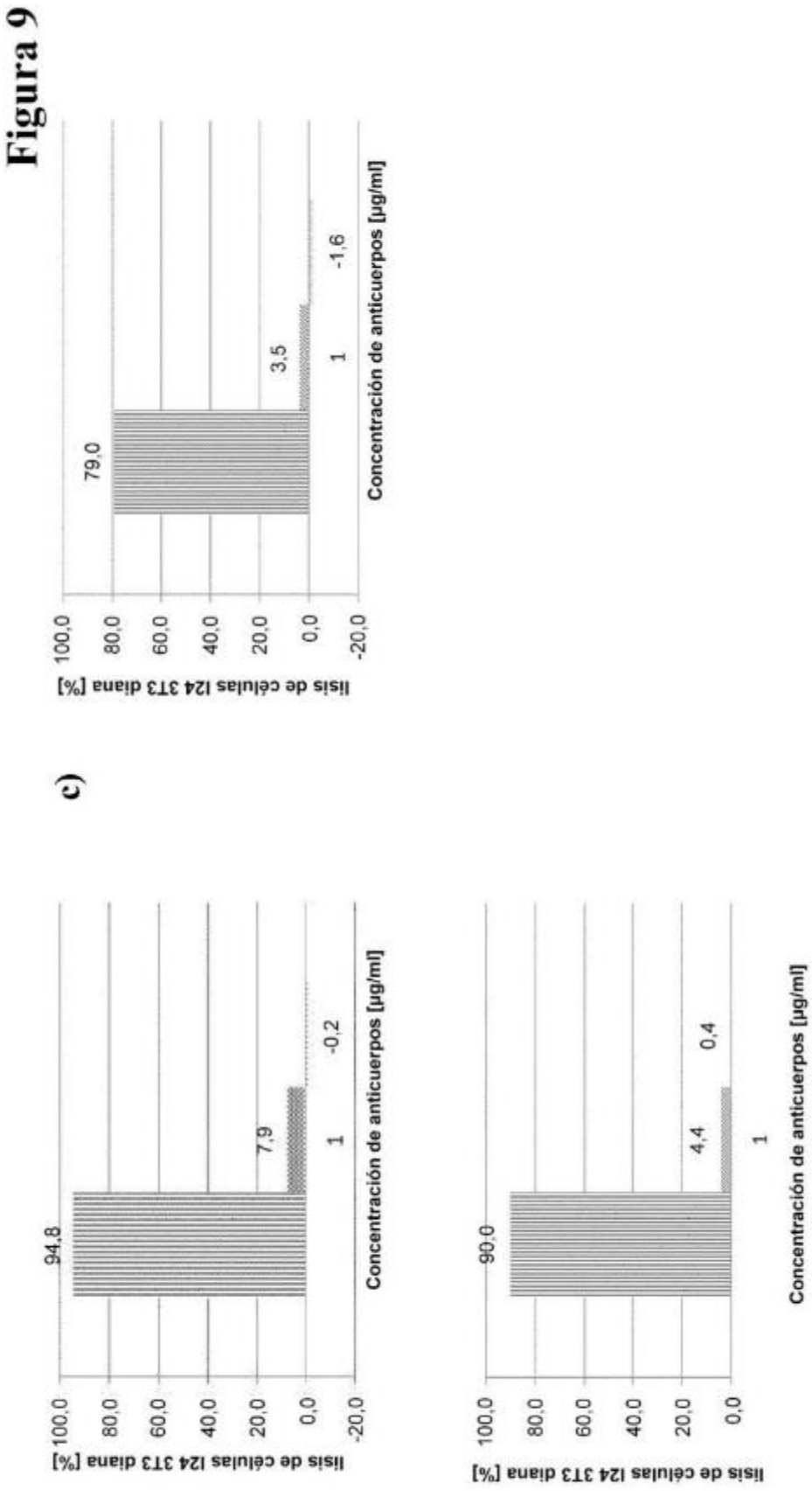

a)
Lisis de células 124 3T3 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
94,8
7,9
1
-0,2
Concentración de anticuerpos [µg/ml]
b)
Lisis de células 124 3T3 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
90,0
4,4
0,4
1
Concentración de anticuerpos [µg/ml]
c)
Lisis de células 124 3T3 diana [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
79,0
3,5
1
-1,6
Concentración de anticuerpos [µg/ml]

Figura 10

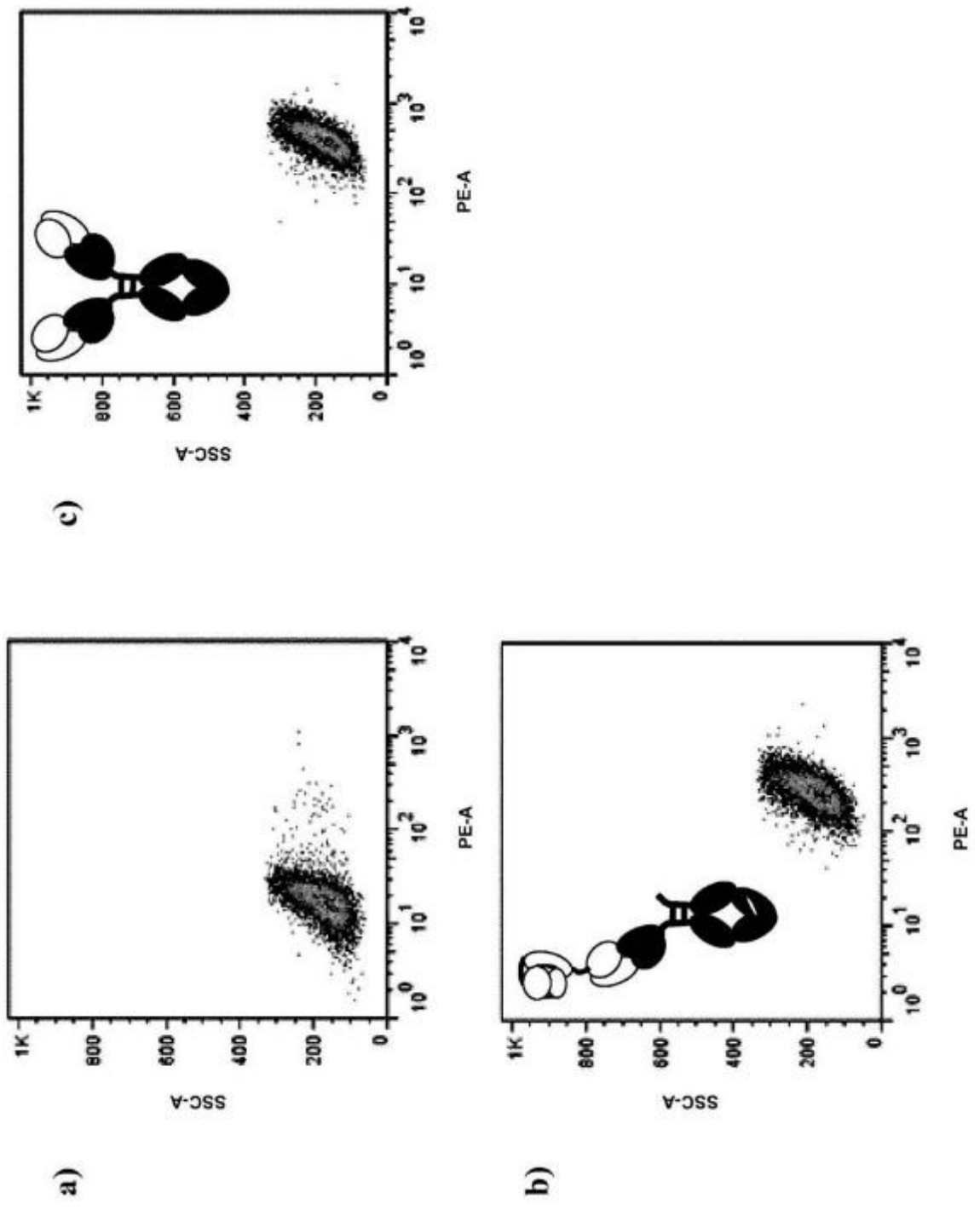


Figura 11

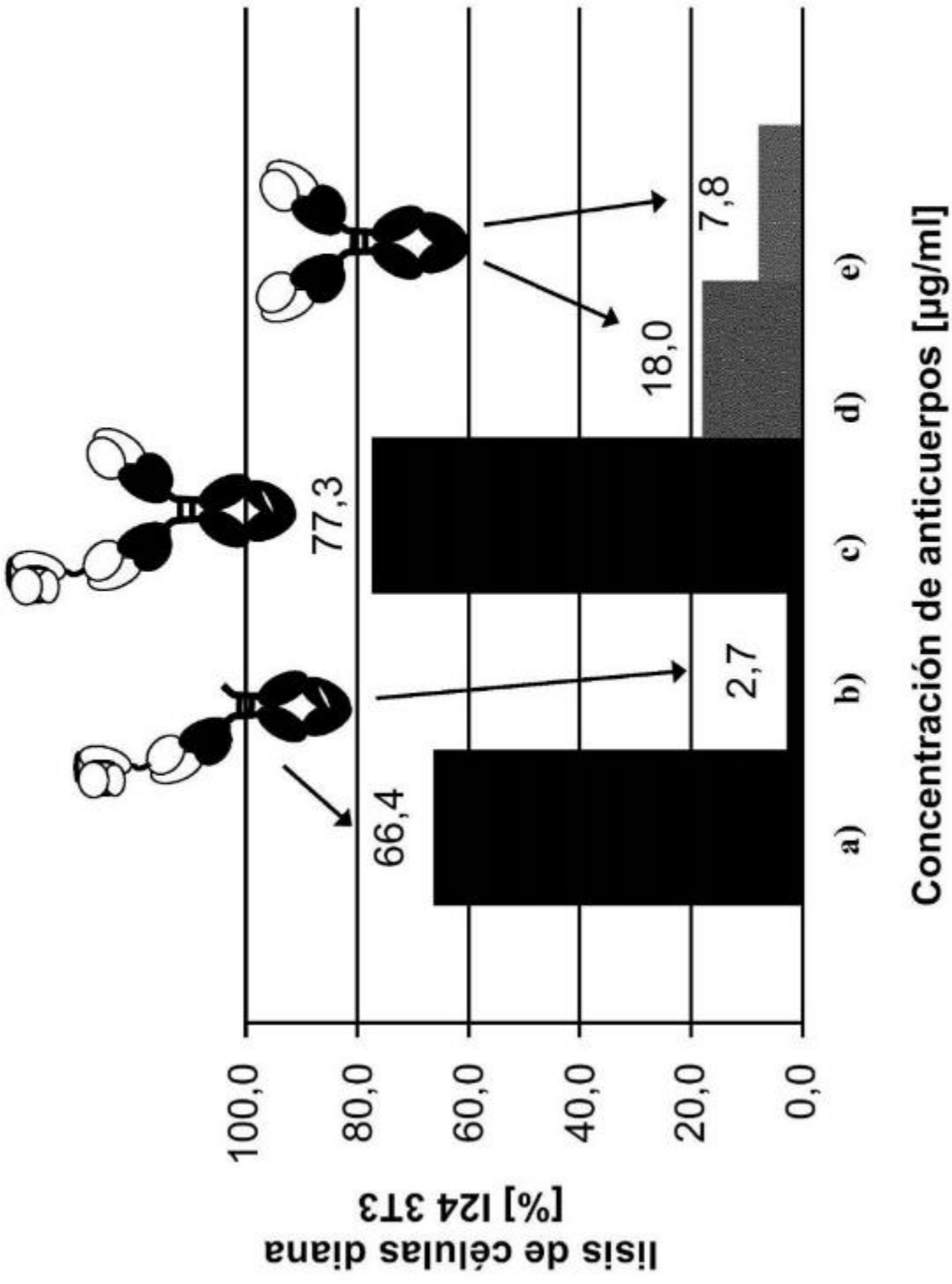

Lisis de células diana
[%] I24 3T3
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
66,4
2,7
77,3
18,0
7,8
a)
b)
c)
d)
e)
Concentración de anticuerpos [µg/ml]

Figura 12

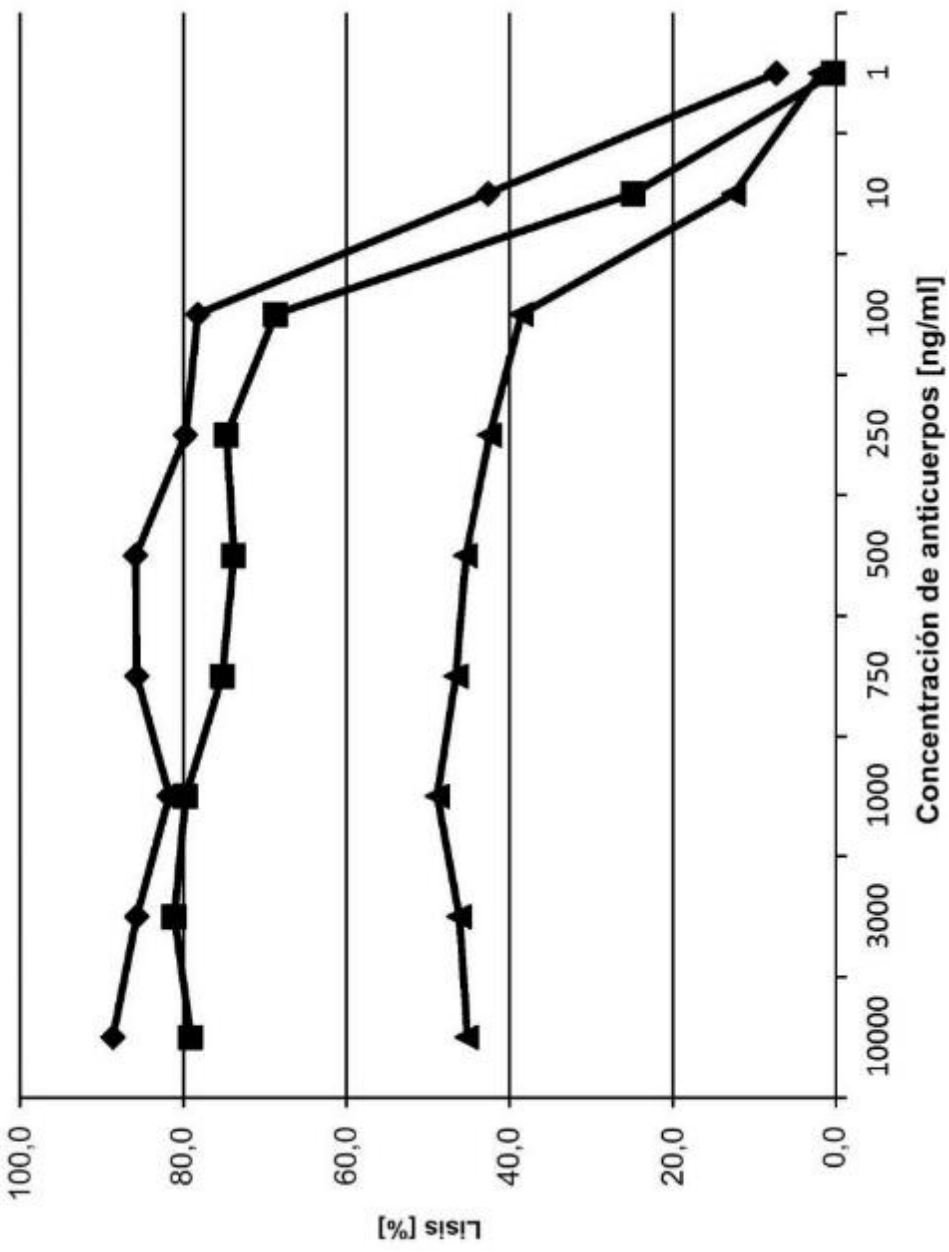

Proporción T:E 1:3
Proporción T:E 1:2
Proporción T:E 1:1
Lisis [%]
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
1
10
100
250
500
750
1000
3000
10000
Concentración de anticuerpos [ng/ml]

Figura 13

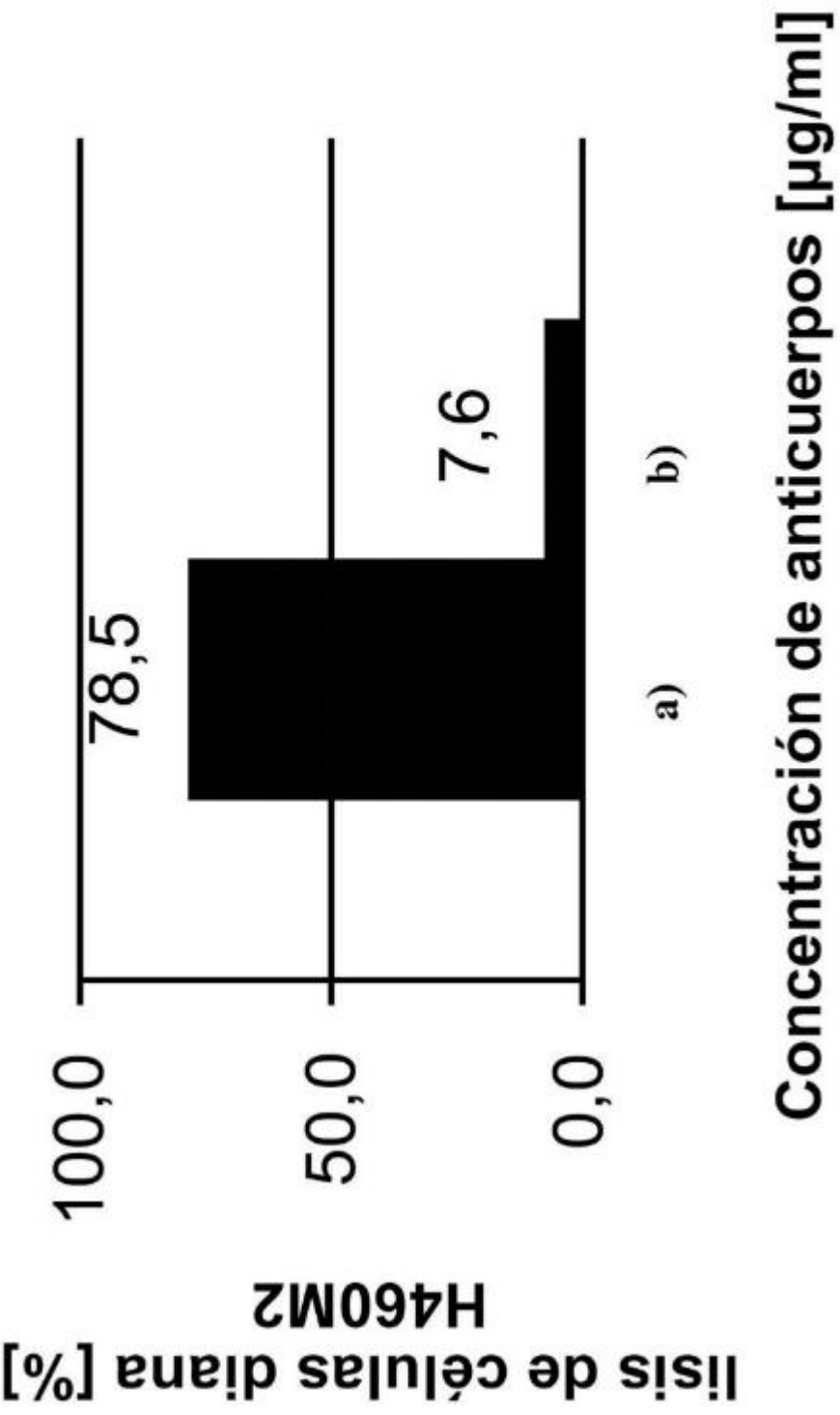

Lisis de células diana [%]
H460M2
100,0
50,0
0,0
78,5
7,6
a)
b)
Concentración de anticuerpos [µg/ml]

Figura 14

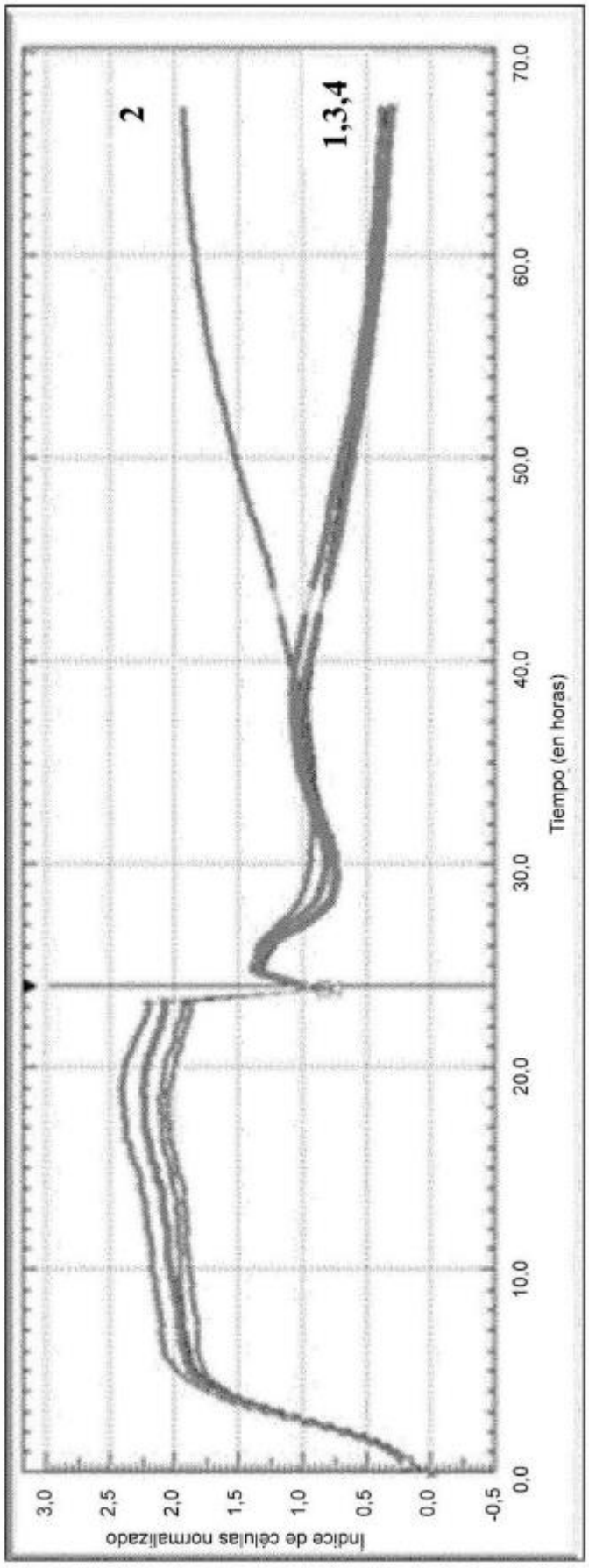

2
1,3,4
Índice de células normalizado
Tiempo (en horas)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0

Figura 15A

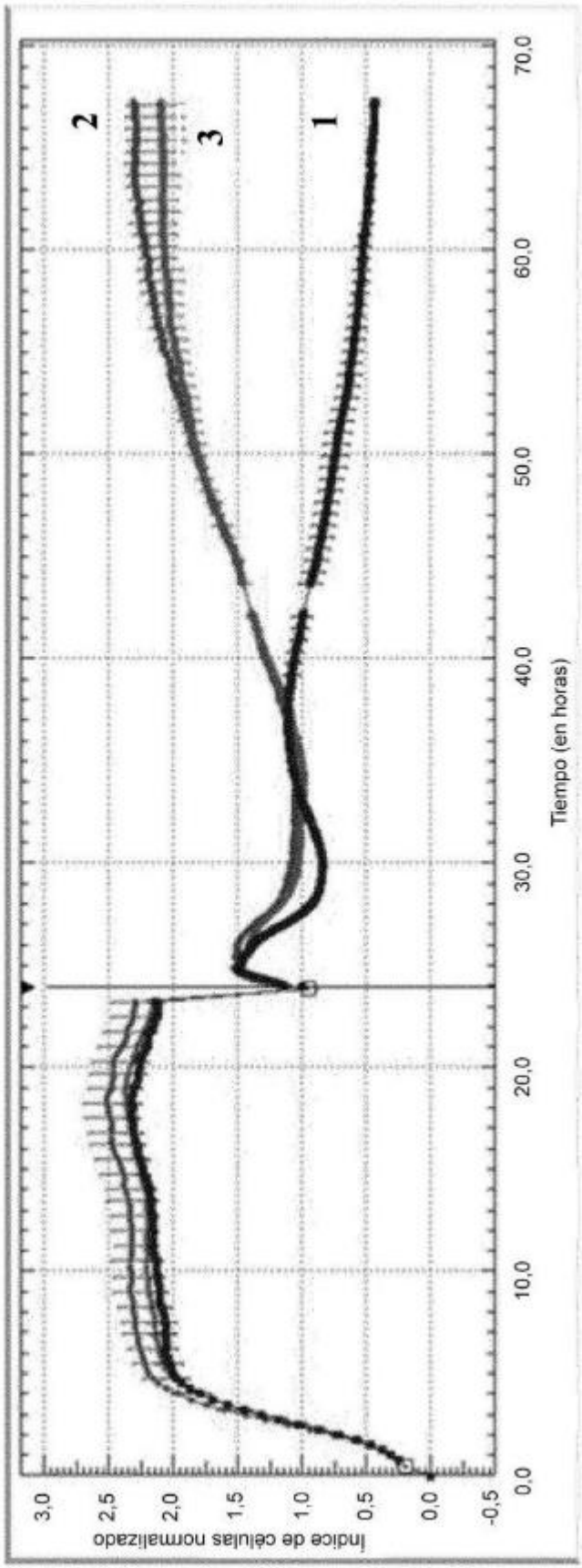

Índice de células normalizado
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
Tiempo (en horas)
1
2
3

Figura 15B

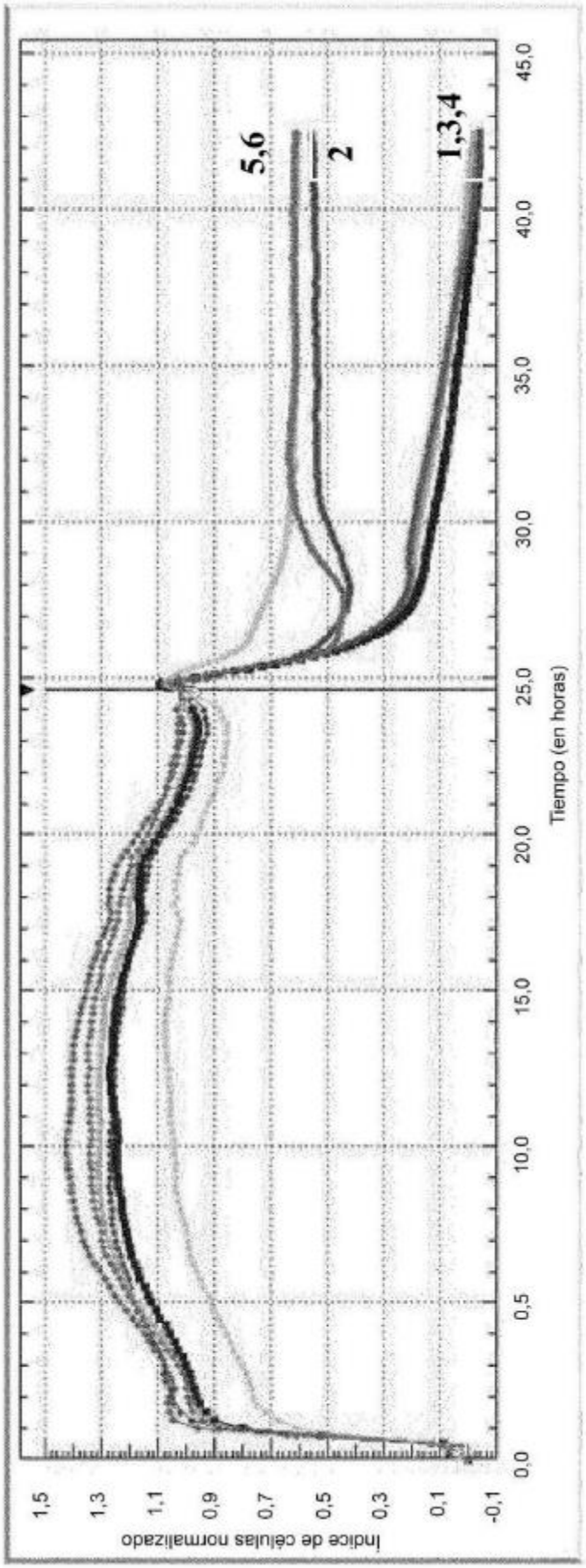

5,6
2
1,3,4
Índice de células normalizado
Tiempo (en horas)
1,5
1,3
1,1
0,9
0,7
0,5
0,3
0,1
-0,1
0,0
0,5
10,0
15,0
20,0
25,0
30,0
35,0
40,0
45,0

Figura 16

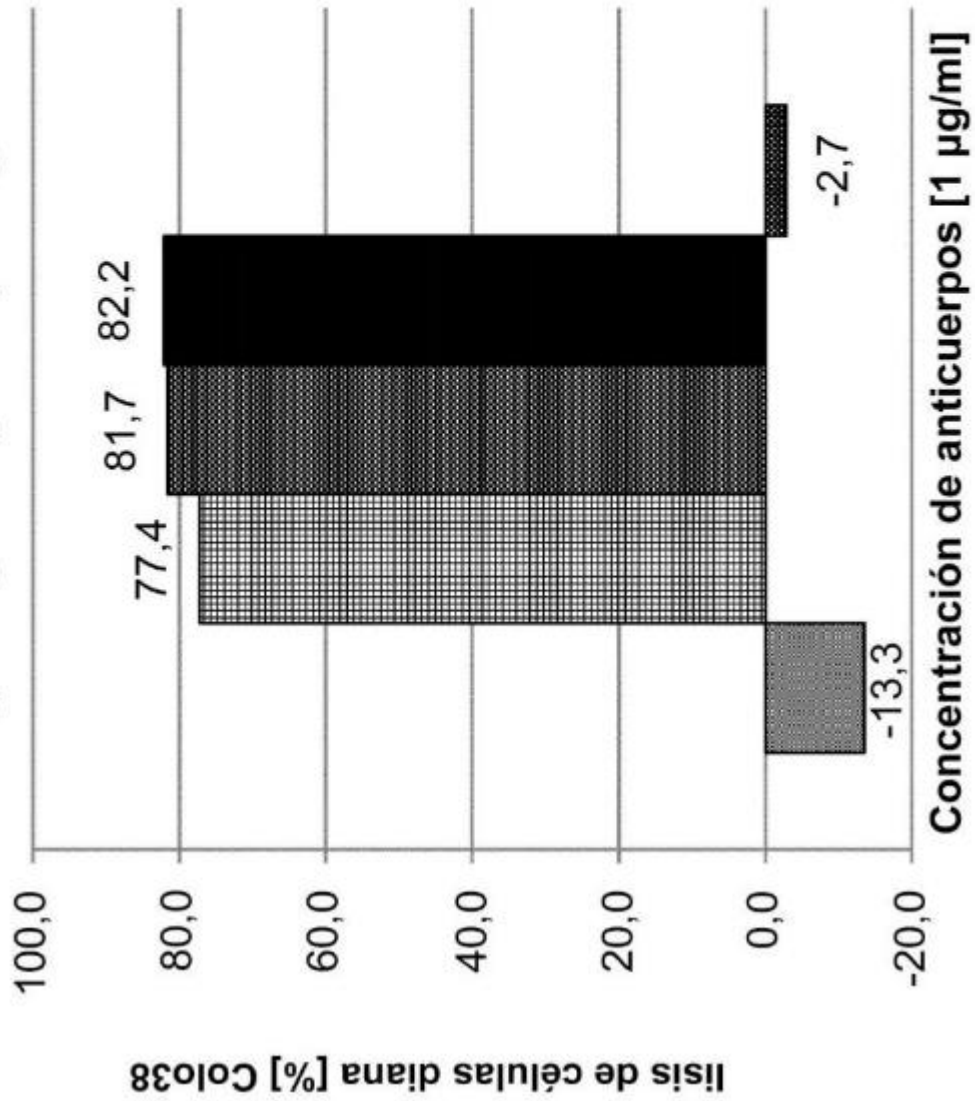

Lisis de células diana [%] Colo38
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
2
1
5
4
3
77,4
81,7
82,2
-13,3
-2,7
Concentración de anticuerpos [1 µg/ml]

Figura 17

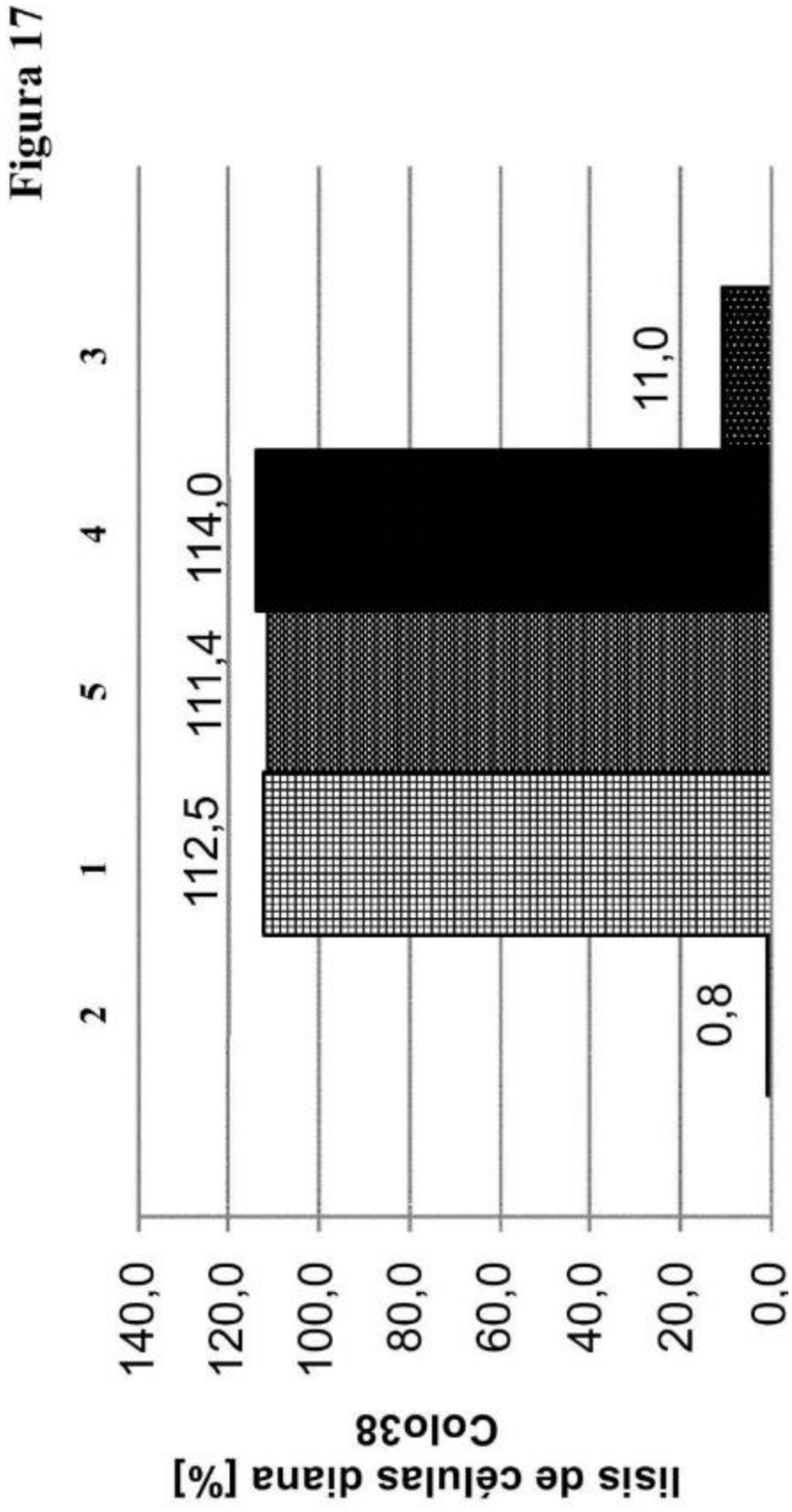

Lisis de células diana [%]
Colo38
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
2
1
5
4
3
112,5
111,4
114,0
0,8
11,0

Figura 18A

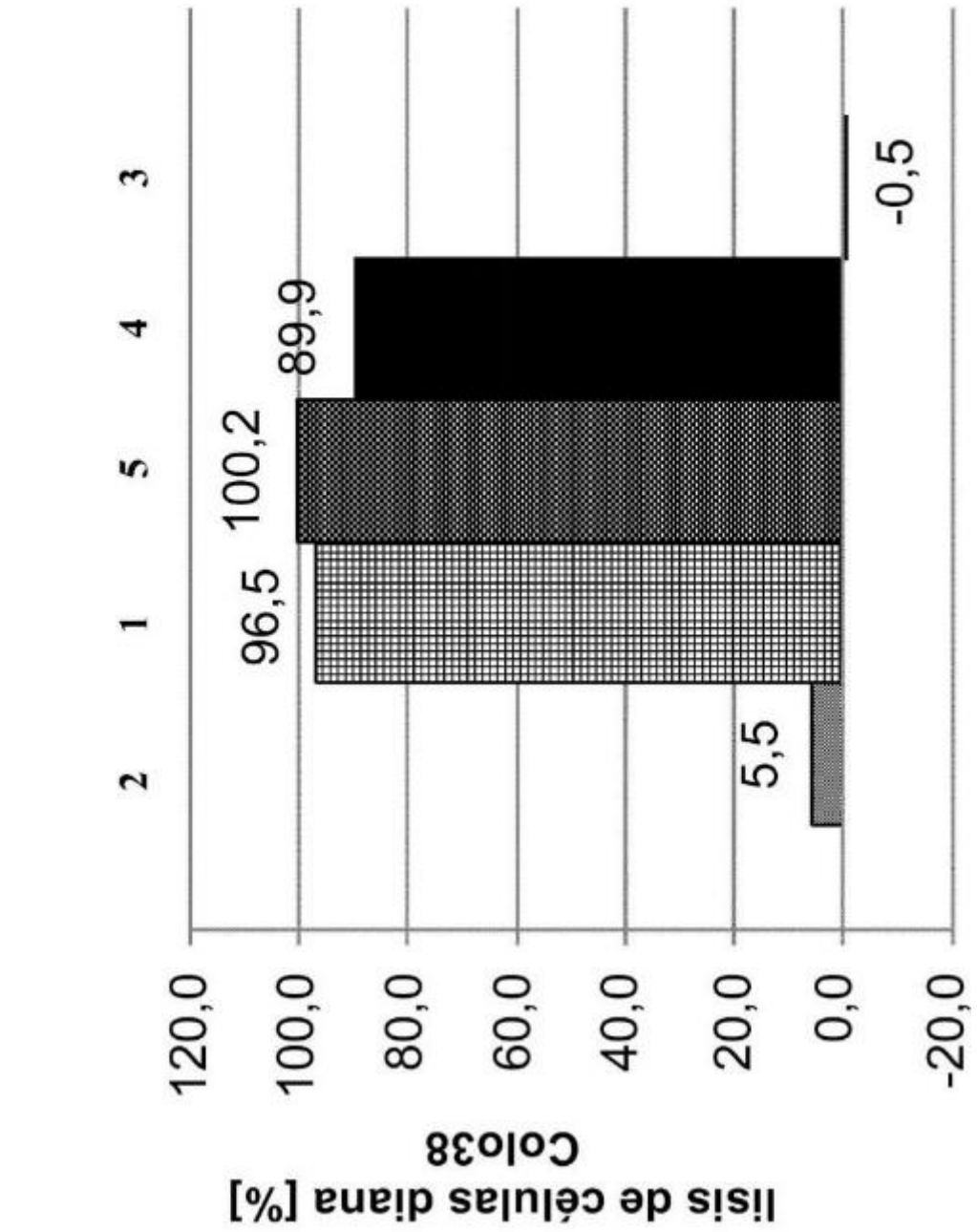

Colo38
lisis de células diana [%]
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
2
1
5
4
3
96,5
100,2
89,9
5,5
-0,5

Figura 18B

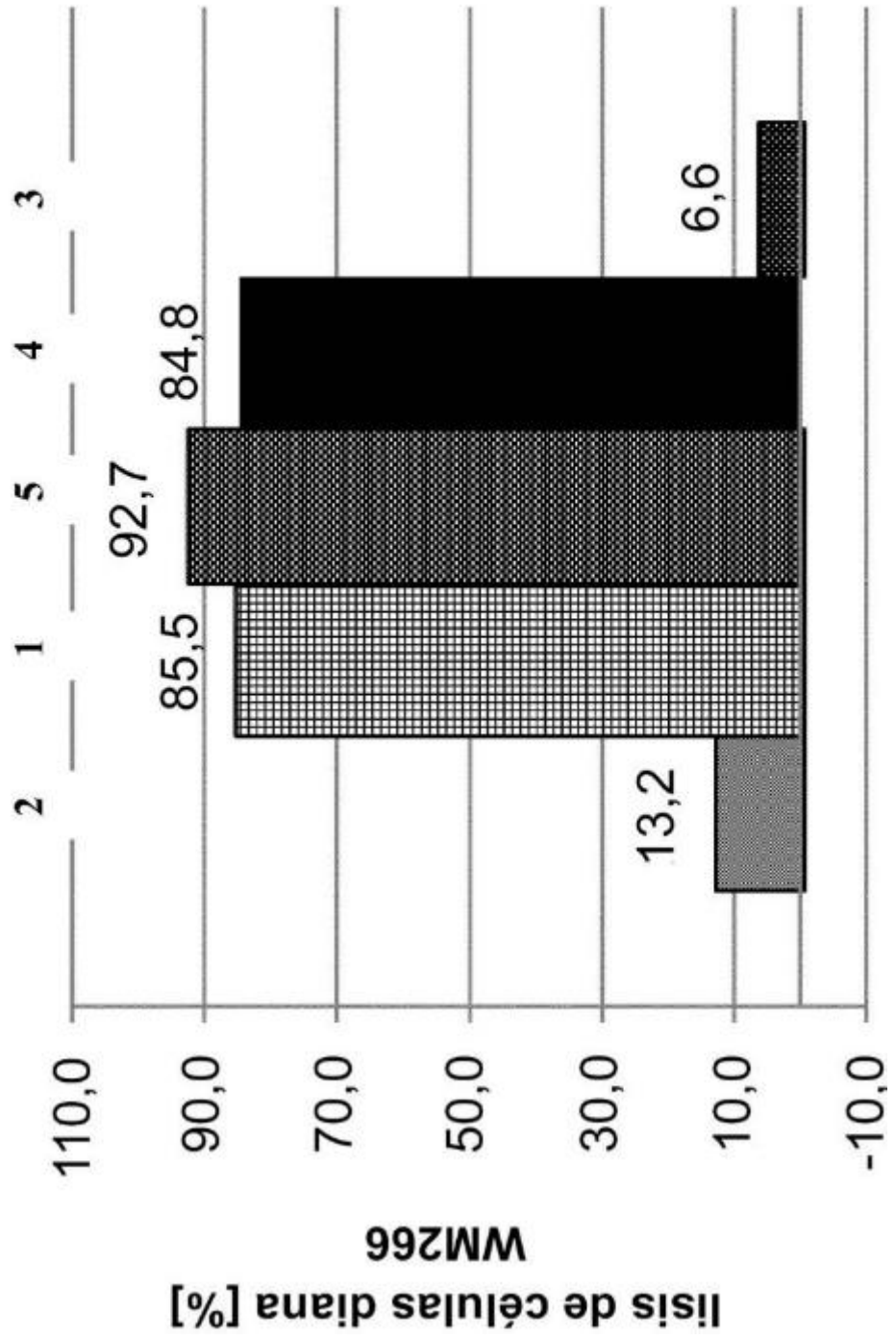

2
1
5
4
3
84,8
92,7
85,5
6,6
13,2
110,0
90,0
70,0
50,0
30,0
10,0
-10,0
WM266
lisis de células diana [%]

Figura 19

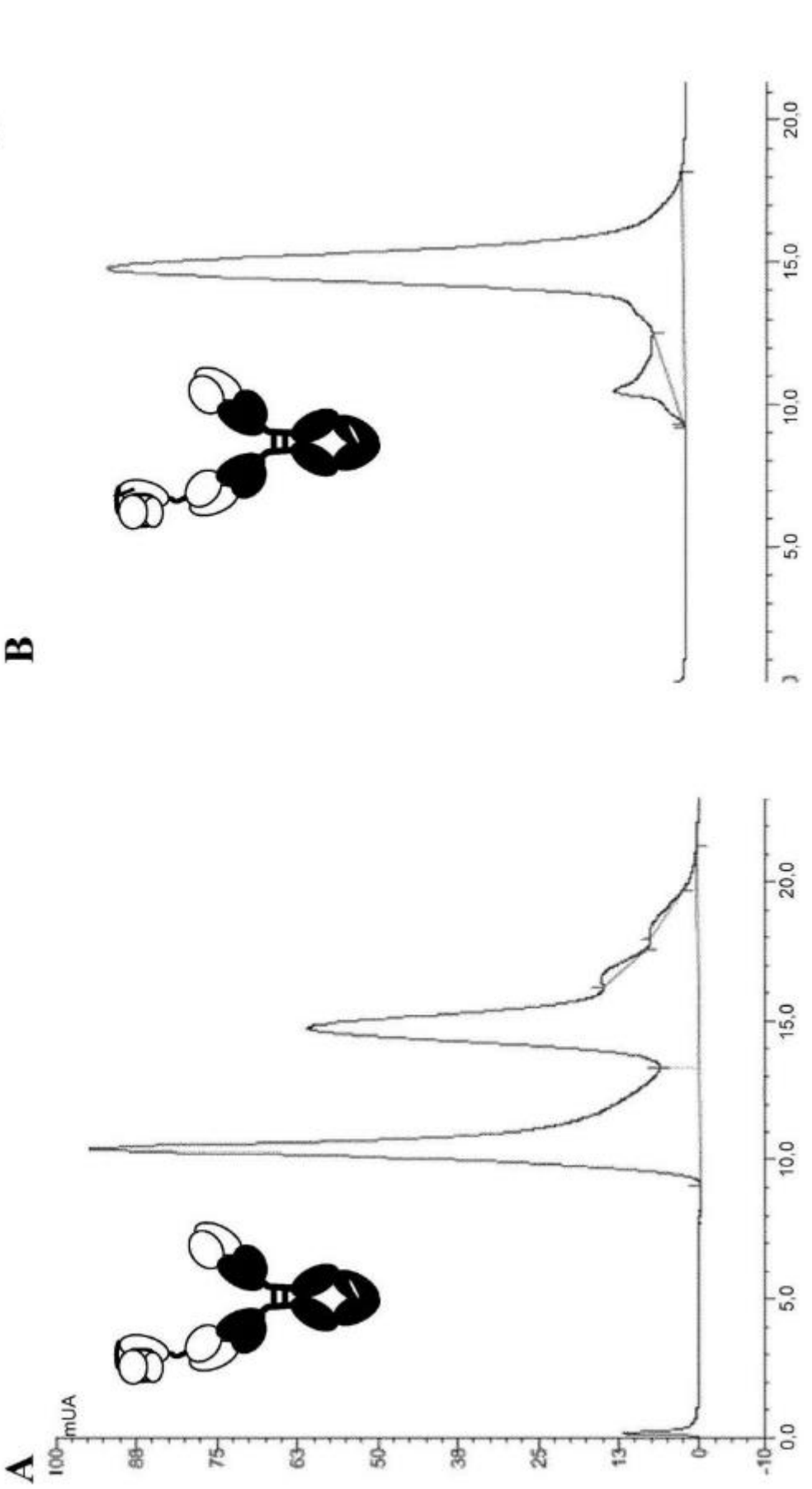


Figura 20

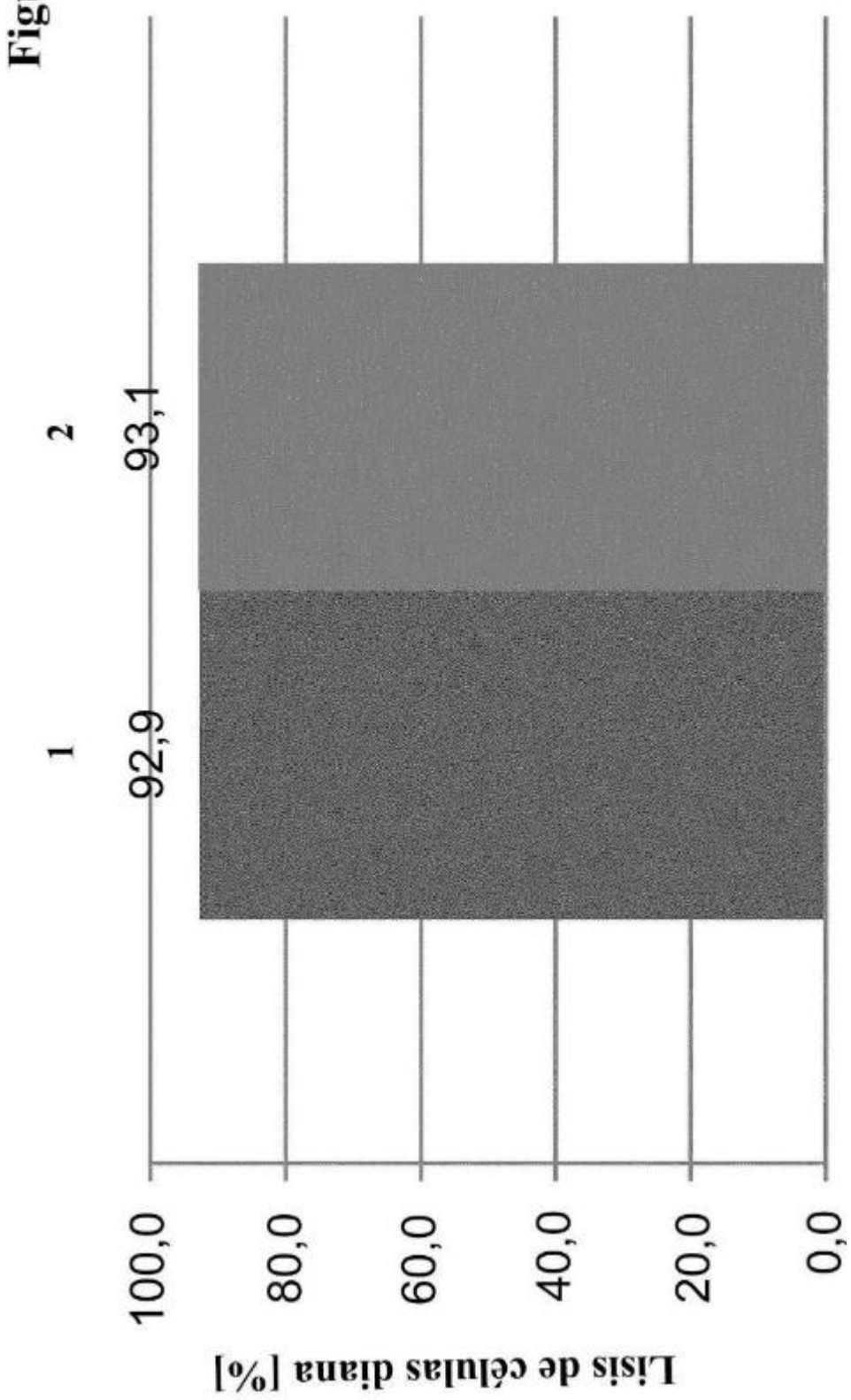
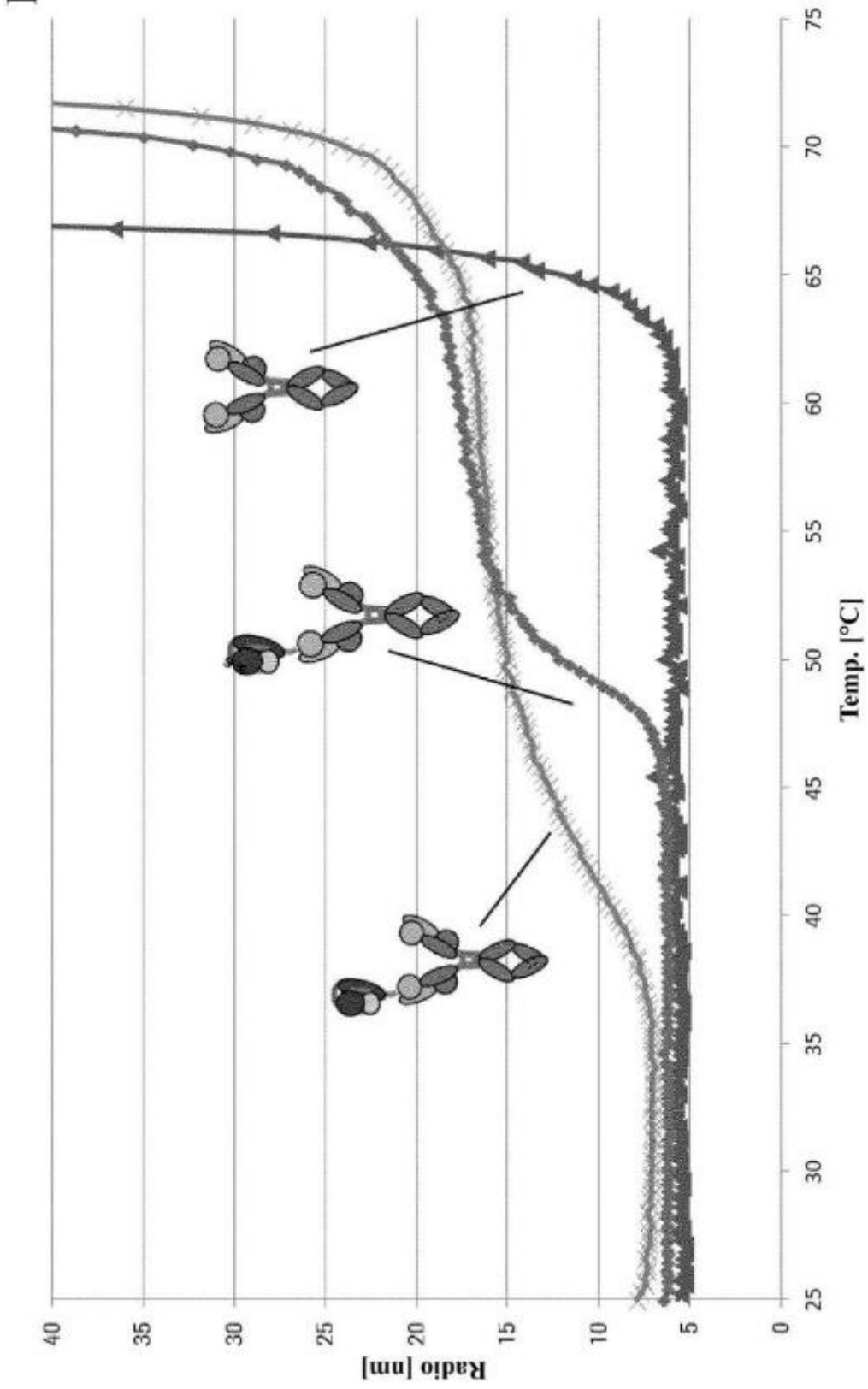


Figura 21


Radio [nm]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
Temp. [°C]