

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 473**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012** E 17153342 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** EP 3210625

54 Título: **Péptidos terapéuticos que comprenden anticuerpos que se unen a la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA)**

30 Prioridad:

30.09.2011 US 201161541921 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2020

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02115-5450, US

72 Inventor/es:

WUCHERPFENNIG, KAI W.;
FRANZ, BETTINA;
MAY, KENNETH, JR.;
DRANOFF, GLENN;
HODI, F. STEPHEN y
HARVEY, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 757 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos terapéuticos que comprenden anticuerpos que se unen a la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA)

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas relacionadas con sujetos humanos.

10 **Antecedentes**

Los sujetos humanos expuestos a una afección o enfermedad proporcionan una fuente de anticuerpos (Ab) con potencial terapéutico y se conocen en la técnica métodos generales para obtener dichos anticuerpos. Sin embargo, los métodos para obtener de manera específica anticuerpos con potencial terapéutico se ven generalmente limitados por la baja frecuencia, la baja velocidad de proliferación, y los bajos niveles de secreción de las células B que expresan dichos anticuerpos. Por ejemplo, las células B de memoria con una especificidad definida suponen normalmente solo una célula por cada millón de células mononucleares de sangre periférica o por cada mililitro de sangre (Lanzavecchia et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 21:298-304 (2009); Yoshida et al., *Immunol. Rev.*, 237:117-139 (2010)). Es probable que la frecuencia de anticuerpos con potencial terapéutico sea incluso menor en los pacientes con cáncer, por lo que se necesita el desarrollo de nuevas estrategias que posibiliten el aislamiento de dichas células con una alta sensibilidad y eficacia.

15

20

25

30

35

Los métodos convencionales se basan generalmente en la conversión de las células B de memoria en células secretoras de anticuerpos mediante cultivo *in vitro* y/o uso de modelos animales inmunizados (por ejemplo, ratones) (Crotty et al., *J. Immunol.*, 171:4969-4973 (2003); Fecteau et al., *Immunology*, 128:e353-e365 (2009); Buisman et al., *Vaccine*, 28:179-186 (2009); Corti et al., *PLoS One*, 5:e8805 (2010)). Por ejemplo, después de un cultivo *in vitro* durante hasta una semana, pueden medirse los anticuerpos en sobrenadantes de cultivo y evaluarse las frecuencias de células secretoras de anticuerpos usando un ensayo puntual inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISPOT). Se han comunicado limitaciones a dichos métodos (Henn et al., *J. Immunol.*, 183:31777-3187 (2009); Cao et al., *J. Immunol., Methods*, 358:56-65 (2010)). Por ejemplo, el cultivo *in vitro* de células B de memoria altera el fenotipo de las células B, haciendo que se asemejen a las células plasmáticas con propiedades funcionales distintas (Jiang et al., *Eur. J. Immunol.*, 37:2205-2213 (2007); Huggins et al., *Blood*, 109:1611-1619 (2007); Jourdan et al., *Blood*, 114:5173-5181 (2009)). También se han comunicado limitaciones para los métodos basados en antígenos fluorescentes (Hofer et al., *Immunol. Rev.*, 211:295-302 (2006); Odendahl et al., *Blood*, 105:1614-1621 (2005); Kunkel et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 3:822-829 (2003); Scheid et al., *Nature*, 458:636-640 (2009); Wu et al., *Science*, 329:856-861 (2010)).

40

Se necesitan métodos mejorados para obtener o dirigirse de manera específica a anticuerpos con potencial terapéutico.

45

50

55

60

MICA (del inglés *MHC class I Chain-related, cadena relacionada con el CMH de clase I*), es un ligando para NKG2D, un receptor transmembrana de tipo II similar a lectina de tipo C, expresado en la mayoría de las células NK humanas, células T $\gamma\delta$ y células T CD8+. Tras su ligamiento, NKG2D señaliza a través de la proteína adaptadora DAP10 para evocar una citólisis dependiente de perforina y proporcionar coestimulación. En los seres humanos, los ligandos de NKG2D incluyen la proteína A relacionada con la cadena de la clase I del CMH (MICA), la estrechamente relacionada MICB, las proteínas de unión a UL-16 (ULBP) 1-4, y RAE-1G. Aunque normalmente no se encuentran ligandos de NKG2D en los tejidos sanos, varias formas de estrés celular, incluyendo el daño en el ADN, pueden regular positivamente la expresión del ligando, dando como resultado su detección frecuente en múltiples neoplasias sólidas y hematológicas, incluyendo el melanoma. La activación de NKG2D a través de células transformadas positivas al ligando contribuye a la supresión tumoral extrínseca, ya que los ratones deficientes para NKG2D y de tipo silvestre tratados con anticuerpos bloqueantes anti-NKG2D manifiestan una susceptibilidad tumoral potenciada. Sin embargo, puede lograrse el escape inmunitario en pacientes mediante la dispersión de ligandos NKG2D por las células tumorales, que desencadena la internalización de NKG2D superficial y una función impedida de los linfocitos citotóxicos. Los ligandos de NKG2D solubles también pueden estimular la expansión de células T NKG2D+CD4+Foxp3- reguladoras que pueden antagonizar la citotoxicidad antitumoral a través del ligando Fas, IL-10, y TGF- β . MICA es un ligando de NKG2D dispersado por células tumorales, es decir, se libera desde la superficie celular al medio circundante, y los sueros de los pacientes de cáncer contienen normalmente niveles elevados de la forma soluble (sMICA). La dispersión de MICA se logra en parte mediante interacciones con la proteína disulfuro isomerasa ERp5, que forma un enlace disulfuro con una cisteína crítica que da como resultado el desplegamiento del dominio α 3, haciendo que sea susceptible a la proteólisis por ADAM-10/17 y MMP14. En el documento WO 03/089616 se describen polipéptidos de MICA y anticuerpos que se unen a MICA.

65

La angiogénesis es el proceso de formas nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes y se ha identificado como una parte crítica del crecimiento y la diseminación tumoral. Los tumores estimulan la angiogénesis para satisfacer las necesidades crecientes de oxígeno y nutrientes, que superan a las que puedan verse satisfechas únicamente por difusión. Por consiguiente, los tumores reclutan, remodelan y expanden la vasculatura existente para

satisfacer sus necesidades metabólicas. El hecho de que los tumores en crecimiento dependan de la formación de nuevos vasos sanguíneos ha hecho que la angiogénesis sea una diana interesante para las terapias anticáncer. Se cree que muchas citocinas desempeñan un papel en la regulación de la angiogénesis, incluyendo los miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las angiopoyetinas. Las angiopoyetinas se descubrieron como ligandos para las Ties, una familia de tirosina cinasas que se expresa de manera selectiva en el endotelio vascular. Existen cuatro angiopoyetinas conocidas: angiopoyetina-1 ("Ang-1") a angiopoyetina-4 ("Ang-4"). Los estudios han sugerido que las angiopoyetinas (por ejemplo, Ang-1 y Ang-2) pueden estar implicadas en la angiogénesis tumoral. Con esta información, las angiopoyetinas han sido identificadas como dianas potenciales para la terapia del cáncer basada en la inmunidad.

Existe la necesidad de identificar nuevos agentes que reconozcan y se unan específicamente a dianas de terapia para el cáncer basada en la inmunidad, tales como MICA y las angiopoyetinas. Dichos agentes podrían ser útiles para una intervención diagnóstica, exploratoria y terapéutica en patologías que están asociadas al desarrollo tumoral.

Sumario

En el presente documento se describen composiciones y métodos relacionados con anticuerpos con potencial terapéutico.

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se une inmuno-específicamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de CMH de clase I (MICA), o a un epítipo de la misma. Dicho anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) y una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H expuesta en la SEQ ID NO: 176 del anticuerpo ID 7; o una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H expuesta en la SEQ ID NO: 194 del anticuerpo ID 8. Además, en el presente documento se describen composiciones que comprenden péptidos que incluyen la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos. Dichos péptidos pueden incluir además la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir además la CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o la CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o ambas. Dichos péptidos pueden incluir la región determinante de la complementariedad CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, o la CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, o ambas. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir además la CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o la CDR1 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o ambas. Dichos péptidos pueden incluir la región determinante de la complementariedad CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, o la CDR1 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, o ambas.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que incluyan: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 2, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, y las regiones en la SEQ ID NO: 2 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 11, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, y las regiones en la SEQ ID NO: 11 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 2 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 11. Además de los péptidos, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) agentes terapéuticos contra el cáncer. Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en forma de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para su administración a un sujeto).

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que incluyan: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 149, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 149 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos

un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 151, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 151 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 149 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 151. Además de los péptidos, las composiciones descritas en el presente documento, incluyen además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) agentes terapéuticos contra el cáncer. Las composiciones descritas en el presente documento se formulan en forma de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para su administración a un sujeto).

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que incluyan: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 168, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 168 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 170, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 170 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según la presente invención, comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 168 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 170. En algunos aspectos, además del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) agentes terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan en forma de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para su administración a un sujeto).

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que incluyan: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 186, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 186 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 188, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 188 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención, comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 186 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 188. En algunos aspectos, además del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, las composiciones pueden incluir además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) agentes terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan en forma de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para su administración a un sujeto).

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que incluyan: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 204, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 204 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 206, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 206 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 204 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 206. Además de los péptidos, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) agentes terapéuticos contra el cáncer. Las composiciones descritas en el

presente documento se formulan en forma de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para su administración a un sujeto).

Además, en el presente documento se describen composiciones que incluyen uno o más péptidos que se unen a angiopoyetina o a un epítipo en la misma. Los péptidos de las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas de aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3. Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir además la CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o la CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o ambas. Dichos péptidos pueden incluir la región determinante de la complementariedad CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1, o la CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1, o ambas. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir además la CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o la CDR1 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, o 5 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, o ambas. Dichos péptidos pueden incluir la región determinante de la complementariedad CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1, o la CDR1 de la V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la tabla 1, o ambas.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 20, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 20 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 29, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 29 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 20 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 29.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, que comprenden: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 38, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 38 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 47, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 47 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 38 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 47.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 56, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 56 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 65, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 65 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que

comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 56 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 65.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 74, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 74 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 83, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 83 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprenda una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 74 y todas las cadenas comprenden la SEQ ID NO: 83. Los péptidos descritos en el presente documento pueden unirse inmunespecíficamente al menos a angiopoyetina-2. Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer. Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende: una cadena V_H con identidad respecto de la SEQ ID NO: 222, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 222 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad respecto de la SEQ ID NO: 224, en los que las regiones correspondientes a la CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y las regiones en la SEQ ID NO: 224 correspondientes a la FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98, 99 %, o 100 % de identidad respecto de la FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1. Los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que comprende una cadena V_H que comprende la SEQ ID NO: 222 y una cadena V_L que comprende la SEQ ID NO: 224. Los péptidos descritos en el presente documento pueden unirse inmunespecíficamente al menos a angiopoyetina-2. Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer. Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer en un sujeto. Los métodos pueden incluir administrar a un sujeto una composición descrita en el presente documento.

En el presente documento también se describen métodos para aislar anticuerpos humanos de pacientes con cáncer después de la inmunoterapia.

En el presente documento se describe un método para obtener células inmunitarias dirigidas contra un autoantígeno de un sujeto, comprendiendo el método identificar a un sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno, proporcionar una forma multimérica del autoantígeno, poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno, y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

En el presente documento se describe un método para obtener células inmunitarias de un paciente con cáncer dirigidas contra un autoantígeno, comprendiendo el método identificar a un sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

5 FIG. 1 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I(MICA)) (SEQ ID NO: 1).
 FIG. 2 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 2).
 FIG. 3 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 10).
 FIG. 4 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 11).
 10 FIG. 5 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 19).
 FIG. 6 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 20).
 FIG. 7 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 28).
 15 FIG. 8 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 29).
 FIG. 9 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 37).
 FIG. 10 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 38).
 FIG. 11 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 46).
 FIG. 12 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 47).
 25 FIG. 13 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 55).
 FIG. 14 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 56).
 FIG. 15 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 64).
 FIG. 16 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 65).
 FIG. 17 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 73).
 35 FIG. 18 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 74).
 FIG. 19 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 82).
 FIG. 20 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 83).
 FIG. 21A-21F | Ilustra métodos a modo de ejemplo para producir anticuerpos a partir de células B. (A) El antígeno se expresa con una etiqueta BirA para la biotilación y tetramerización de sitio específico con estreptavidina marcada fluorescentemente. (B) Las células monoclonales se tiñen con tetrámero y un panel de anticuerpos monoclonales. Las células B de memoria con intercambio de clase Tetrámero⁺, son células individuales clasificadas en tiras de PCR. (C) La amplificación del ARNm se efectúa con ARN polimerasa T7. (D) La secuenciación de los productos de la PCR se lleva a cabo usando productos de la PCR de 300-400 pb. (E) Se usa PCR solapada para la construcción de secuencias de cadena pesada kappa/lambda de IgG1 de longitud completa que se clonan en vectores separados. Los vectores se transfectan de manera transitoria en células CHO-S para la expresión de anticuerpos recombinantes completamente humanos. (F) Se ensayan los anticuerpos respecto de la unión a antígeno y se evalúan respecto de sus potenciales propiedades terapéuticas.
 45 FIG. 22A-22B | Gráficas que muestran la comparación del antígeno monomérico y tetramérico para la identificación de células B de memoria. (A) Los antígenos TTCF o CD80 mono-biotinilados se etiquetaron directamente con el fluoróforo Alexa-488; los tetrámeros se generaron con estreptavidina no etiquetada. Las células B enriquecidas de cada donante se separaron en tres fracciones y se tiñeron con tetrámero de CD80 de control, monómero de TTCF, o tetrámero de TTCF a la misma concentración de antígeno total de 0,125 µg/ml. Las gráficas de FACS ilustran a las células B de memoria con intercambio de clase CD19⁺ CD27⁺ IgM⁺; los números adyacentes a la ventana representan el porcentaje de la ventana parental. (B) Frecuencias de células B de memoria tetrámero⁺ detectadas en tres donantes distintos. Los números se calculan como células tetrámero⁺ por cada 1x10⁶ células B de memoria CD19⁺.
 50 FIG. 23A-23B | Diagramas lineales que muestran la unión de alta afinidad a TTCF por los anticuerpos generados a partir de plasmablastos y células B de memoria. Se llevaron a cabo experimentos de unión de saturación para determinar las afinidades de los anticuerpos recombinantes. El antígeno TTCF se etiquetó con europio, que emite una fuerte señal fluorescente a 615 nm tras su incubación con un agente quelante. Los anticuerpos se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con TTCF-europio (100 nM a 4 pM) durante dos horas a 37 °C. Se registraron las cuentas de fluorescencia a 615 nm y se calculó la K_D usando análisis de regresión no
 65

lineal. En todos los experimentos se incluyó el anticuerpo de control (clon 8.18.C5) que también se produjo en células CHO-S. (A) Los Ab 1 y 2 para TTCF se generaron a partir de plasmablastos tetrámero de TTCF⁺ (donante 1). (B) Los anticuerpos para TTCF 3, 4, y 5 se originaron a partir de células B de memoria tetrámero de TTCF⁺ de tres donantes diferentes.

5 FIG. 24 | Diagrama de barras que muestra la unión de anticuerpos anti-MICA a perlas luminex recubiertas con MICA.

FIG. 25A-25O | Diagramas lineales que muestran la unión de anticuerpos anti-MICA a perlas recubiertas de MICA.

10 FIG. 26A-26D | Diagramas de barras que muestran la unión de cuatro anticuerpos específicos para angiopoyetina 2 humana, así como un anticuerpo de control a tres angiopoyetinas humanas (angiopoyetina-1, 2 y 4) y similar a ang-3. Las angiopoyetinas recombinantes se inmovilizaron en una placa de ELISA y se detectó la unión de anticuerpos recombinantes humanos con estreptavidina etiquetada con europio.

15 FIG. 27A-27C | Muestran gráficas y un gel relacionados con el aislamiento de anticuerpos específicos para angiopoyetina de un paciente de cáncer de pulmón. (A) Reactividad con angiopoyetina-2 del suero de paciente con cáncer de pulmón (L19) (diluido a 1:1000) determinada mediante ELISA. (B) Gráfica de FACS que presenta la muestra de PBMC (instante- 10/98) clasificada en células B CD19⁺, CD27⁺ IgM con CD 19 en el eje X y angiopoyetina-2 etiquetada fluorescentemente en el eje Y. (C) Productos de la PCR de cadena pesada, ligera y de la región bisagra de 10 células B de memoria reactivas con angiopoyetina-2 aisladas del paciente L19. El marcador de 500 pares de bases está indicado a la izquierda.

20 FIG. 28 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I(MICA)) (SEQ ID NO: 148).

FIG. 29 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 149).

FIG. 30 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 150).

25 FIG. 31 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 151).

FIG. 32 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de CMH de clase I(MICA)) (SEQ ID NO: 167).

30 FIG. 33 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 168).

FIG. 34 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 169).

FIG. 35 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 170).

35 FIG. 36 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de CMH de clase I(MICA)) (SEQ ID NO: 185).

FIG. 37 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 186).

40 FIG. 38 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 187).

FIG. 39 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 188).

FIG. 40 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA)) (SEQ ID NO: 203).

45 FIG. 41 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 204).

FIG. 42 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 205).

50 FIG. 43 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 206).

FIG. 44 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 221).

FIG. 45 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 222).

55 FIG. 46 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 223).

FIG. 47 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEQ ID NO: 224).

60 FIG. 48A-G | Gráficas lineales que muestran la evaluación de la unión específica de alelo de MICA por anticuerpos recombinantes anti-MICA.

FIG. 49 | Gráfica lineal que muestra el etiquetado de células tumorales autólogas por el anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002.

65 FIG. 50 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA sérico. Se incubaron células NK humanas con suero de control del paciente CM24002 y una dilución 1:10 durante 48 horas. Los anticuerpos indicados se añadieron al inicio de la incubación a una concentración de 10 µg/ml. La expresión de NKG2D se evaluó en células NK CD56⁺ mediante citometría de flujo.

FIG. 51 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA recombinante. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante a una concentración de 2 ng/ml durante 48 horas. Los anticuerpos indicados se añadieron al inicio de la incubación a una concentración de 10 µg/ml. Después de 48 horas, La expresión de NKG2D se evaluó en células NK CD56+ mediante citometría de flujo.

FIG. 52 | Gráfica lineal que muestra la potenciación de la toxicidad mediada por células por el anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante (2 ng/ml) durante 48 horas en presencia de los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. Se evaluó la capacidad de las células NK (efectoras) para eliminar a las células diana K562 midiendo la liberación de LDH después de 4 horas de incubación a las proporciones indicadas.

FIG. 53 | Diagrama de barras que demuestra la toxicidad mediada por células por los anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante (2 ng/ml) durante 48 horas en presencia de los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. Se evaluó la capacidad de las células NK (efectoras) para eliminar a las células diana K562 midiendo la liberación de LDH después de 4 horas de incubación. Se añadió anticuerpo de bloqueo de NKG2D o anticuerpo de bloqueo de Fc durante la incubación de 4 h de células efectoras y diana para evaluar la contribución del receptor Fc y de NKG2D a la toxicidad mediada por células.

FIG. 54 | Una serie de gráficas lineales que muestran la unión del dominio alfa 3 de MICA por anticuerpos recombinantes anti-MICA. Se biotinilaron los dominios alfa 3 de MICA recombinante y se capturaron sobre la superficie de perlas recubiertas con estreptavidina. Los anticuerpos indicados se incubaron a 10 µg/ml con las perlas recubiertas con la proteína recombinante individual durante 1 h. Posteriormente, se lavaron las perlas y se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado a FITC. La fluorescencia de FITC se cuantificó por citometría de flujo.

FIG. 55 | Diagramas lineales que demuestran la unión de células tumorales por los anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

FIG. 56 | Diagrama de barras que demuestra la especificidad alélica de MICA de los anticuerpos anti-MICA Ab29 CM33322 determinada mediante el ensayo Luminex.

FIG. 57 | Diagramas de barras que muestran la unión del anticuerpo específico anti-angiopoyetina 2, Ab2 anti-Ang6, así como de un anticuerpo de control a tres angiopoyetinas humanas (angiopoyetina-1, 2 y 4) y similar a ang-3. Las angiopoyetinas recombinantes se inmovilizaron en una placa de ELISA y se detectó la unión de anticuerpos recombinantes humanos con estreptavidina etiquetada con europio.

Descripción detallada

La presente divulgación está basada, en parte, en la observación de que pueden obtenerse anticuerpos dirigidos contra dianas terapéuticas importantes en una enfermedad de sujetos humanos expuestos a la enfermedad mediante el etiquetado de células B con una forma tetramérica del antígeno de interés. Tal como se ha descrito en la sección de antecedentes anterior, los métodos anteriores están limitados al menos en tanto que son ineficaces para identificar células B adecuadas en sujetos humanos y/o debido a que inducen cambios fenotípicos en las células B capturadas, reduciendo de este modo su valor. Sin embargo, en el presente documento se describen métodos que permiten la captura de células B de memoria escasas dirigidas contra antígenos específicos relacionados con enfermedades. Tal como se describe más adelante, los métodos requieren la tetramerización del antígeno relacionado con la enfermedad, potenciando dicho método, tal como se demuestra en los ejemplos más adelante, la identificación de células B de memoria adecuadas. Específicamente, los métodos del presente documento permiten una captura más eficaz de células B de memoria adecuadas durante periodos de tiempo prolongados después de la exposición inicial de un sujeto al antígeno. Los métodos en el presente documento incluyen también anticuerpos (y péptidos generados a partir de las secuencias de dichos anticuerpos) generados usando material genético obtenido de células B de memoria capturadas usando los métodos descritos en el presente documento.

En el presente documento se describen anticuerpos humanos contra la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA) y anticuerpos humanos dirigidos contra angiopoyetina-2. Ambos tipos de anticuerpos humanos se identificaron en pacientes que habían recibido una vacuna para el cáncer a base de células (células tumorales autólogas transducidas por GM-CSF) mediante métodos que implican el uso de antígenos tetraméricos.

En el presente documento se describen métodos para obtener o dirigir anticuerpos de manera específica con potencial terapéutico a partir de sujetos humanos seleccionados y composiciones terapéuticas resultantes de los mismos. Estos métodos pueden incluir: obtener o dirigir células inmunitarias en un sujeto humano, incluyendo las células inmunitarias, pero sin limitación, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, aislar o purificar material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) de las células inmunitarias obtenidas o dirigidas, y usar el material genético purificado o aislado para producir composiciones terapéuticas, por ejemplo, composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento. Se proporciona una descripción adicional de los métodos en la sección titulada "Métodos", más adelante.

En el presente documento también se describen composiciones terapéuticas (que incluyen, por ejemplo, péptidos terapéuticos, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo y/o conjugados de anticuerpo) relacionadas con anticuerpos presentes en sujetos que tienen o han tenido una afección o enfermedad y que mostraron una respuesta inmunitaria hacia la afección o enfermedad.

Composiciones terapéuticas

5 En algunos casos, las composiciones terapéuticas del presente documento pueden interactuar con (por ejemplo, unirse, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a compañeros de unión (por ejemplo, inmunógenos, antígenos, y/o epítomos) relacionados con una enfermedad o afección, en las que la interacción entre la composición terapéutica y los compañeros de unión da como resultado una respuesta inmunitaria positiva hacia la afección o enfermedad (por ejemplo, una reducción en el nivel de enfermedad o síntomas de la misma en un sujeto).

10 En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente, o consisten en) al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (V_H) y/o la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1, 2, 3, 4, o 5, 6, 7, 8, 9 o 10, mostrado en la tabla 1.

15 En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente, o consisten en) al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (V_H) y/o la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, mostrado en la tabla 1, y que interactúa con (por ejemplo, se une, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA (por ejemplo, UniGene Hs.130838)) (por ejemplo, MICA soluble (sMICA)) y/o a angiopoyetina-2 (por ejemplo, UniGene Hs.583870), incluyendo epítomos de las mismas.

25 En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, los péptidos pueden incluir al menos dos CDR, en los que las al menos dos CDR son CDR mostradas en la tabla 1 para diferentes anticuerpos. En otras palabras, las CDR (y las secuencias de FR y/o de AA) mostradas en la tabla 1 para los anticuerpos ID 1, 6, 7, 8 y 9 son intercambiables y pueden combinarse para generar péptidos, en tanto que los péptidos se unan (por ejemplo, se unan específicamente y/o se unan inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 y al menos una de la FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen una de las SEQ ID NO: 2, 149, 168, 186 o 204 y/o una de las SEQ ID NO: 11, 151, 170, 188, o 206. En cada caso, un péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μ M, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

45 En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 6 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 149 y/o la SEQ ID NO: 151. En cada caso, un péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μ M, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

55 En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 7 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 168 y/o la SEQ ID NO: 170. En cada caso, un péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μ M, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 8 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 186 y/o la SEQ ID NO: 188. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 9 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 204 y/o la SEQ ID NO: 206. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humano (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, los péptidos pueden incluir al menos dos CDR, en los que las al menos dos CDR son CDR mostradas en la tabla 1 para diferentes anticuerpos. En otras palabras, las CDR (y las secuencias de FR y/o de AA) mostradas en la tabla 1 para los anticuerpos ID 2, 3, 4, 5, y 10 son intercambiables y pueden combinarse para generar péptidos, en tanto que los péptidos se unan (por ejemplo, se unen específicamente y/o se unen inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 y al menos una de la FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10, 5, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen una de las SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, o 222 y/o una de las SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83 o 224. En algunos casos, los péptidos incluyen una de las SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, o 222 y una de las SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83 o 224. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana (por ejemplo, UniGene Hs.583870)).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 2 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 20 y/o la SEQ ID NO: 29. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 3 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L

del anticuerpo ID 3 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 38 y/o la SEQ ID NO: 47. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 4 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 56 y/o la SEQ ID NO: 65. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de unión entre el péptido y angiopoyetina-2 puede ser entre X-Y, por ejemplo, X-Y, X-Y. En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 5 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 74 y/o la SEQ ID NO: 83. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1, en las que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 10 y la CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 y al menos una FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen la SEQ ID NO: 222 y/o la SEQ ID NO: 224. En cada caso, en péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1 μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, los péptidos que se unen a angiopoyetina-2 también pueden unirse a angiopoyetina-1 (por ejemplo, Unigene Hs.369675) y/o a angiopoyetina-4 (por ejemplo, Unigene Hs.278973). Por ejemplo, en algunos casos, los péptidos que se unen a angiopoyetina-2 también pueden unirse específicamente y/o inmuno-específicamente en relación a otros antígenos (distintos de angiopoyetina-2) a angiopoyetina-1. En algunos casos, los péptidos que se unen a angiopoyetina-2 también pueden unirse específicamente y/o inmuno-específicamente en relación a otros antígenos (distintos de angiopoyetina-4) a angiopoyetina-4.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen: la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 11; la SEQ ID NO: 149 y/o la SEQ ID NO: 151; la SEQ ID NO: 168 y/o la SEQ ID NO: 170; la SEQ ID NO: 186 y/o la SEQ ID NO: 188; la SEQ ID NO: 204 y/o la SEQ ID NO: 206; la SEQ ID NO: 20 y/o la SEQ ID NO: 29; la SEQ ID NO: 38 y/o la SEQ ID NO: 47; la SEQ ID NO: 56 y/o la SEQ ID NO: 65; la SEQ ID NO: 74 y/o la SEQ ID NO: 83; y la SEQ ID NO: 222 y/o la SEQ ID NO: 224.

TABLE 1

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.##
1	MICA humana	V _H	QVQLQQ W GAGLLKP SETLALT CAVS (SEQ ID NO: 3)	GGSFTH Y (SEQ ID NO: 4)	WSWIR QAPGK GLEWIGE (SEQ ID NO: 5)	INHSGVT (SEQ ID NO: 6)	NYNPS LKSRLT ISVDTS KSQFSL RLTSVT AADTA LYYC (SEQ ID NO: 7)	AKTG LYYD DWW GTRF PRGG FDS (SEQ ID NO: 8)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 2 (véase FIG. 2)	SEQ ID NO: 1 (véase FIG. 1)
		V _L	DIVMTQS PD SLAVSLG ERATINC KSS (SEQ ID NO: 12)	QSILYSSD NKNY (SEQ ID NO: 13)	LAWYQ HKPGQPP KLLFY (SEQ ID NO: 14)	WAS (SEQ ID NO: 15)	IRESG VPDRF SGGSGT DFTLT ISSLQA EDVAV YYC (SEQ ID NO: 16)	QQYVSP PCS (SEQ ID NO: 17)	FGQGTK LEIQ (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11 (véase FIG. 4)	SEQ ID NO: 10 (véase FIG. 3)
		V _H	QVQLQES GPGIVEP SGTSLT CTVS (SEQ ID NO: 152)	GGISRS NW (SEQ ID NO: 153)	WSWVRQ PPGEGLE WIGE (SEQ ID NO: 154)	IHHIGRS (SEQ ID NO: 156)	SYNPSLK SRVTMS VDKSN QFSLRLT SVTAAD TAVVY	CAKNGYY AMDVW (SEQ ID NO: 158)	GQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 155)	SEQ ID NO: 149 (véase FIG. 28)	SEQ ID NO: 148 (véase FIG. 29)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.#
6	MICA humana	V _L	EIVLTQS PGTLSLS PGERATL SCRAS (SEQ ID NO: 159)	QSVSSDF (SEQ ID NO: 160)	LAWYQQ KPGQAPR LLIY (SEQ ID NO: 161)	ATS (SEQ ID NO: 162)	FRATGIS DRFSGSG SGTDFSL TINRLEP EDFAVYY (SEQ ID NO: 163)	CQHRYRSS PPWYTF (SEQ ID NO: 164)	AQGTKL DMRRTV AAPSV (SEQ ID NO: 165)	SEQ ID NO: 151 (véase FIG. 31)	SEQ ID NO: 150 (véase FIG. 30)
			QVQLQES GPGLVKP SGTSLT CAVS (SEQ ID NO: 171)	GASITNG AW (SEQ ID NO: 172)	WSWVRQ PPGKGLE WIGE (SEQ ID NO: 173)	IYLNQNT (SEQ ID NO: 174)	NSNPSLK SRVIISVD KSKNHFS LTLNSVT AADTAV YY (SEQ ID NO: 166)	CAKNAAY NLEFW (SEQ ID NO: 176)	GQGALVT VSS (SEQ ID NO: 177)	SEQ ID NO: 168 (véase FIG. 33)	SEQ ID NO: 167 (véase FIG. 32)
7	MICA humana	V _H	EIVLTQS PGTLSLS PGERATL SCRAS (SEQ ID NO: 178)	QTVSSPY (SEQ ID NO: 179)	VAWYQQ KRGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 180)	GAS (SEQ ID NO: 181)	TRATGIP DRFSGSG SGTDFTL TISRLEP EDFAVYY (SEQ ID NO: 182)	CQQYDRS YYYTF (SEQ ID NO: 183)	GQGTKLE IK (SEQ ID NO: 184)	SEQ ID NO: 170 (véase FIG. 35)	SEQ ID NO: 169 (véase FIG. 34)
			QVQLQES GPGLVKP SGTSLT CAVS (SEQ ID NO: 171)	GASITNG AW (SEQ ID NO: 172)	WSWVRQ PPGKGLE WIGE (SEQ ID NO: 173)	IYLNQNT (SEQ ID NO: 174)	NSNPSLK SRVIISVD KSKNHFS LTLNSVT AADTAV YY (SEQ ID NO: 166)	CAKNAAY NLEFW (SEQ ID NO: 176)	GQGALVT VSS (SEQ ID NO: 177)	SEQ ID NO: 168 (véase FIG. 33)	SEQ ID NO: 167 (véase FIG. 32)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nuc.##
8	MICA humana	V _H	QVQLQES GPGLVKP SENLSLT CTVS (SEQ ID NO: 189)	DASMSD YH (SEQ ID NO: 190)	WSWIRQ AAGKGLE WIGR (SEQ ID NO: 191)	MYSTGSP (SEQ ID NO: 192)	YYKPSLK GRVTMSI DTSKNQ FSLKLAS V TAADTAI YY (SEQ ID NO: 193)	CASGQHI GGWVPP DFW (SEQ ID NO: 194)	GQGTLLVT VSS (SEQ ID NO: 195)	SEQ ID NO: 186 (véase FIG. 37)	SEQ ID NO: 185 (véase FIG. 36)
		V _L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCRSS (SEQ ID NO: 196)	EGLVYSD GDTY (SEQ ID NO: 197)	LSWFHQ RPGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 198)	KIS (SEQ ID NO: 199)	NRFSGVP DRFSGSG AGTDFTL KISRVEA EDVGVY Y (SEQ ID NO: 200)	CMQATH FPWTF (SEQ ID NO: 201)	GQGTKVE VKR (SEQ ID NO: 202)	SEQ ID NO: 188 (véase FIG. 39)	SEQ ID NO: 187 (véase FIG. 38)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl. #
9	MICA humana	V _H	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAAS (SEQ ID NO: 207)	GFTFSSY G (SEQ ID NO: 208)	LTWIRQA PGKGLE WVSS (SEQ ID NO: 209)	ISGSGNN T (SEQ ID NO: 210)	YYADSVK GRFTISR DKVKKKT LYLQMD SLTVGDT AVYY (SEQ ID NO: 211)	CLGVGQ (SEQ ID NO: 212)	GHGIPVI VSS (SEQ ID NO: 213)	SEQ ID NO: 204 (véase FIG. 41)	SEQ ID NO: 203 (véase FIG. 40)
		V _L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCRSS (SEQ ID NO: 214)	QSLVHRD GNTY (SEQ ID NO: 215)	LSWFLQ RPGQAPR LLIY (SEQ ID NO: 216)	RIS (SEQ ID NO: 217)	NRFSGVP DRFSGSG AGTDFTL KISRVEA EDVGVY Y (SEQ ID NO: 218)	CMQATQI PNTF (SEQ ID NO: 219)	GQGTKLE IK (SEQ ID NO: 220)	SEQ ID NO: 206 (véase FIG. 43)	SEQ ID NO: 205 (véase FIG. 42)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.##
2	Angiopoyetina- 2	V _H	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAAS (SEQ ID NO: 21)	GFTFSY A (SEQ ID NO: 22)	MSWVRQ APGKGLE WVSG (SEQ ID NO: 23)	IYWSGGS T (SEQ ID NO: 24)	YYADSVK GRFTI SRDISKN TLYLQM NSLRAD D TAVYYC (SEQ ID NO: 25)	ARGDYYG SGAHFDY (SEQ ID NO: 26)	WGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 27)	SEQ ID NO: 20 (véase FIG. 6)	SEQ ID NO: 19 (véase FIG. 5)
		V _L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCRSS (SEQ ID NO: 30)	QSLVHSD GNTY (SEQ ID NO: 31)	LSWLQQ RPGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 32)	QIS(SEQ ID NO: 33)	NRFSGVP DRFSGS GAGTDF TLKISR EAEDVG VYYC (SEQ ID NO: 34)	MQGTQF PRT (SEQ ID NO: 35)	FGQGTKV EIK (SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 29 (véase FIG. 8)	SEQ ID NO: 28 (véase FIG. 7)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl. #
3	Angiopoyetina- 2	V _H	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAAS (SEQ ID NO: 39)	GFTFSNN W (SEQ ID NO: 40)	MHWVR QAPGKGL EWISE (SEQ ID NO: 41)	IRSDGNF T (SEQ ID NO: 42)	RYADSM KGRFTI SRDNAK STLYLQ MNSLRV ED TGLYYC (SEQ ID NO: 43)	ARDYPYS IDY (SEQ ID NO: 44)	WGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 45)	SEQ ID NO: 38 (véase FIG. 10)	SEQ ID NO: 37 (véase FIG. 9)
		V _L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCTSS (SEQ ID NO: 48)	QSLVHSN GNTY (SEQ ID NO: 49)	LSWLQQ RPGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 50)	EIS (SEQ ID NO: 51)	KRVSGVP DRFSGSG AGTDFTL KISRVEA EDVGVY YC (SEQ ID NO: 52)	MQKGQL RT (SEQ ID NO: 53)	FGQGTKL EIK (SEQ ID NO: 54)	SEQ ID NO: 47 (véase FIG. 12)	SEQ ID NO: 46 (véase FIG. 11)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	GDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.##
4	Angiopoyetina- 2		EVQLVES GGGLVQP GGSVRLS CAAS (SEQ ID NO: 57)	GFILSNF A (SEQ ID NO: 58)	MSWVRQ A PGKGLD WVSG (SEQ ID NO: 59)	NFGGRE NT (SEQ ID NO: 60)	YY ADSVKG RFTI SRDSSKS TLYLQM NNLRAE D TAVYYC (SEQ ID NO: 61)	ARGD YHGSGAH FDY (SEQ ID NO: 62)	WGQGILV TVSS (SEQ ID NO: 63)	SEQ ID NO: 55 (véase FIG. 14)	SEQ ID NO: 55 (véase FIG. 13)
			DIVMTQS PLS SPVILGQ PASISCRS S (SEQ ID NO: 66)	QSLI HSDGNT Y (SEQ ID NO: 67)	LSWLHQ RPGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 68)	QIS (SEQ ID NO: 69)	NRF SGVPDRF SGS GTGTDF TLKISR EAEDAGI YYC (SEQ ID NO: 70)	MQGTEFP RT (SEQ ID NO: 71)	FGQGTKV EIK (SEQ ID NO: 72)	SEQ ID NO: 64 (véase FIG. 16)	SEQ ID NO: 64 (véase FIG. 15)
	Angiopoyetina- 2	V _H	EVQLVES GGG LIQPGGS LRLSCAT S (SEQ ID NO: 75)	GFTFR TSS (SEQ ID NO: 76)	MSWVRR A PGKGLE WVSA (SEQ ID NO: 77)	IGAESH D T (SEQ ID NO: 78)	HY TDSAEG RFTI SKDYSK NTVYLQ MNGLRV	AHHYYG SRQKPKD WGDAFD M (SEQ ID NO: 80)	WGQ GTMVSVS S (SEQ ID NO: 81)	SEQ ID NO: 73 (véase FIG. 18)	SEQ ID NO: 73 (véase FIG. 17)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.#
5			DIQMTQS PSS VSASVGD RVTITCR AS (SEQ ID NO: 84)	QDIS TW (SEQ ID NO: 85)	LTWYQQ RAGKAP NLLLY (SEQ ID NO: 86)	GAS (SEQ ID NO: 87)	TLEDGVP S RFSGSGS GTD FTLTIDS LQPDDF ATYYC (SEQ ID NO: 88)	QQ SHSFPYT (SEQ ID NO: 89)	FGQ GTQLGIS (SEQ ID NO: 90)	SEQ ID NO: 83 (véase FIG. 20)	SEQ ID NO: 82 (véase FIG. 19)

(continuación)

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Ácido Nucl.#
10	Angiopoietina- 2	V _H	EVQLVES GGGLIQP GGSLRLS CAAS (SEQ ID NO: 225)	GFLISSYF (SEQ ID NO:226)	MSWVRQ APGKQPE WVSV (SEQ ID NO: 227)	IYSDGST (SEQ ID NO:228)	YYVDSVK GRFTIST DNSKNT LYLQMN SLRAEDT ARYY (SEQ ID NO: 229)	CATRLN YDGDHW (SEQ ID NO: 230)	GQGTLLVT VSSASTK (SEQ ID NO: 175)	SEQ ID NO: 222 (véase FIG. 45)	SEQ ID NO: 221 (véase FIG. 44)
		V _L	DVVMQTQ SPLSLPV TLGQPAS ISCRSS (SEQ ID NO: 231)	QSLVHSD GNTY (SEQ ID NO: 232)	LNWFHQ RPGQSPR RLIY (SEQ ID NO: 233)	KVS (SEQ ID NO:234)	KRDSGV PDRFSGS GSGSDFT LKISRVE AEDVGIY Y (SEQ ID NO: 235)	CMQGTGTH WPTF (SEQ ID NO: 236)	GQGTKVE IKRTVAA (SEQ ID NO: 237)	SEQ ID NO: 224 (véase FIG. 47)	SEQ ID NO: 223 (véase FIG. 46)

* Las secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y/o 100 % de identidad de secuencia respecto de las secuencias mostradas.

** Las secuencias pueden incluir una, dos, tres, cuatro, cinco, o menos de diez modificaciones de aminoácidos conservativas.

Las secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y/o 100 % de identidad de secuencia respecto de las secuencias mostradas, por ejemplo, en regiones correspondientes a la FR1, FR2, FR3, y/o FR4, y/o una, dos, tres, cuatro, cinco, o menos de diez modificaciones de aminoácidos conservativas en las regiones correspondientes a las CDR 1, 2, y/o 3.

Las secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y/o 100 % de identidad de secuencia respecto de las secuencias mostradas, en las que las secuencias codifican el AA correspondiente.

A.A. # muestra la secuencia de aminoácidos de V_H o V_L.

Ácido Nuc. ## muestra la secuencia de ácido nucleico de V_H o V_L.

Aunque anteriormente se han mostrado las regiones CDR y FR, dichas regiones también pueden definirse según Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es acorde con la de Kabat.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo anticuerpos de longitud completa y/o intactos, o fragmentos de anticuerpo. Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente a anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o una cadena individual del mismo, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o una subclase de los mismos), y el anticuerpo no es necesariamente de una clase concreta. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas clases se puede subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma, y mu, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos de unión a epítipo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un solo dominio, dominios de anticuerpo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpo que muestran la actividad biológica deseada (por ejemplo, la porción de unión a antígeno), Fv unidas por disulfuro (dsFv), y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos útiles en la invención), intracuerpos (*intrabodies*) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser humanos o humanizados.

Los fragmentos de anticuerpos son útiles para su uso en los métodos descritos en el presente documento en tanto que retengan la afinidad y especificidad deseadas del anticuerpo de longitud completa. Por lo tanto, un fragmento de un anticuerpo anti-MICA o el anticuerpo anti-angiopoyetina retendrá la capacidad de unirse a MICA o a angiopoyetina, respectivamente, en la porción Fv y la capacidad para unirse al receptor Fc en células dendríticas en la porción FC. Dichos fragmentos se caracterizan por propiedades similares a las del anticuerpo anti-MICA de longitud completa o del anticuerpo anti-angiopoyetina correspondiente, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno MICA o al antígeno de angiopoyetina, respectivamente, expresado sobre la superficie de una célula humana o al antígeno sMICA correspondiente que se ha dispersado en el medio.

Un fragmento Fv es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque normalmente con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpo Fv monocatenarios o (scFv) comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, lo que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

El fragmento Fab contiene un dominio variable y un constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que normalmente están unidos covalentemente en las proximidades de sus extremos carboxilo mediante cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los diacuerpos (*diabodies*) son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos una V_H conectada a una V_L en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno.

Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-CH1-V_H-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo útiles en la presente invención pueden modificarse en la región Fc para

proporcionar las funciones efectoras o la semivida en suero deseadas. En algunos casos, la región Fc puede conjugarse a PEG o a albúmina para aumentar la semivida en suero, o cualquier otra conjugación que dé como resultado el efecto deseado. Como alternativa, cuando sea deseable eliminar o reducir la función efectora, con el fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse determinadas regiones Fc diferentes.

Los anticuerpos humanos y humanizados incluyen anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de (o que tienen la misma secuencia de aminoácidos que aquellas derivadas de) secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o de sitio específico *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular en la CDR3.

Una "CDR" de un dominio variable es los restos de aminoácidos dentro de la región hipervariable que se identifican según las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de las definiciones tanto de Kabat y Chothia, AbM, contact, y/o conformacionales o cualquier método para la determinación de las CDR bien conocido en la técnica. Las CDR de anticuerpo pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas por Kabat et al. Véase, por ejemplo, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de los bucles estructurales descritas originariamente por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883. Otras estrategias para la identificación de CDR incluyen la definición "AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se obtiene usando el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (en la actualidad Accelerlys®), o la "definición contact" de las CDR basándose en contactos con antígeno observados, expuesta en MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro enfoque, se hace referencia en el presente documento a la "definición conformacional" de las CDR, pudiendo identificarse las posiciones de las CDR como los restos que efectúan contribuciones entálpicas a la unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Otras definiciones de límites de las CDR diferentes pueden no seguir estrictamente una de las estrategias anteriores, pero sin embargo se solapan con al menos una porción de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la vista de la predicción o de los hallazgos experimentales de que restos o grupos de restos particulares o incluso las CDR completas no tienen un impacto significativo en la unión al antígeno. Tal como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas mediante cualquier estrategia conocida en la técnica, incluyendo combinaciones de estrategias. Los métodos usados en el presente documento pueden utilizar las CDR definidas según cualquiera de estas estrategias. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse según cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extended, AbM, contact, y/o conformacionales.

En algunos casos, las secuencias de aminoácidos de los péptidos divulgados en el presente documento pueden modificarse y variarse para crear variantes de péptidos (por ejemplo, péptidos con una homología de secuencia definida respecto de los péptidos divulgados en el presente documento), por ejemplo, en tanto que se mantenga o mejore la propiedad de unión a antígeno de la variante peptídica en relación al péptido no modificado (las propiedades de unión a antígeno de cualquier péptido modificado pueden evaluarse usando los ensayos *in vitro* y/o *in vivo* descritos en el presente documento y/o técnicas conocidas en la especialidad).

Aunque las variantes peptídicas se observan y discuten a nivel de aminoácidos, las modificaciones reales se introducen o efectúan normalmente a nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, pueden generarse variantes con un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de los péptidos mostrados en la tabla 1 modificando los ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 1, 10, 19, 28, 37, 46, 55, 64, 73, y/u 82 o porciones/fragmentos de las mismas, usando técnicas (por ejemplo, técnicas de clonación) conocidas en la técnica y/o que se divulgan en el presente documento.

Las modificaciones de secuencia de aminoácidos se encuentran normalmente en una o más de tres clases: modificaciones por sustitución, por inserción o por eliminación. Las inserciones incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxilo así como inserciones intra-secuencia de restos de aminoácido individuales o múltiples. Las inserciones serán normalmente inserciones menores que aquellas de las fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Las eliminaciones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de proteína. Normalmente, se eliminan no más de aproximadamente 2 a 6 restos en cualquier sitio dentro de la molécula de proteína. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de restos individuales, pero pueden producirse en cualquier número de ubicaciones diferentes a la vez; las inserciones serán normalmente del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos; y las eliminaciones variarán de aproximadamente 1 a 30 restos. Pueden efectuarse eliminaciones o inserciones en pares adyacentes, es decir, una eliminación de 2 restos o una inserción de 2 restos. Pueden combinarse sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para obtener una construcción final. Las mutaciones no deben desplazar la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que puedan producir una estructura secundaria en el ARNm. Las modificaciones por sustitución son aquellas en las que se ha retirado al menos un resto y se ha insertado un resto diferente en su lugar. En algunos casos, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos casos, los péptidos en el presente documento pueden

incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Por ejemplo, las variantes pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-30, 30-40, o 40-50 sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Como alternativa, las variantes pueden incluir 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Dichas sustituciones se efectúan generalmente de acuerdo con la tabla 2 a continuación y se citan como sustituciones conservativas. Se conocen en la técnica métodos para predecir la tolerancia a la modificación de proteínas (véase, por ejemplo, Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 101(25):9205-9210 (2004)).

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos conservativas

Aminoácido	Sustituciones (se conocen otras en la técnica)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

En algunos casos, las sustituciones no son conservativas. Por ejemplo, puede reemplazarse un aminoácido en un péptido mostrado en la tabla 1 por un aminoácido que pueda alterar alguna propiedad o aspecto del péptido. En algunos casos, pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, para cambiar la estructura de un péptido, para cambiar las propiedades de unión de un péptido (por ejemplo, para aumentar o reducir la afinidad de unión del péptido a un antígeno y/o para alterar o reducir la especificidad de unión del péptido al antígeno).

En algunos casos, los péptidos y/o variantes peptídicas pueden incluir o pueden ser fragmentos de los péptidos mostrados en la tabla 1. Dichos fragmentos pueden incluir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 50-100, 101-150, menos fragmentos que las CDR, FR, y/o AA mostrados en la tabla 1, por ejemplo, en tanto que los fragmentos retengan al menos una parte de las propiedades de unión del péptido de longitud completa (por ejemplo, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % de las propiedades de unión del péptido de longitud completa). Pueden efectuarse truncamientos en el extremo amino-terminal, el extremo carboxilo-terminal, y/o entre los péptidos en el presente documento.

En algunos casos, la cara de una variante peptídica que interactúa puede ser la misma (por ejemplo, sustancialmente la misma) que la de un péptido no modificado, por ejemplo, para alterar (por ejemplo, aumentar o reducir), conservar, o mantener las propiedades de unión de la variante peptídica en relación al péptido no modificado. Se conocen en la técnica métodos para identificar la cara que interactúa de un péptido (Gong et al., BMC: Bioinformatics, 6:1471-2105 (2007); Andrade y Wei et al., Pure and Appl. Chem., 64(11):1777-1781 (1992); Choi et al., Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 77(1):14-25 (2009); Park et al., BMC: and Bioinformatics, 10:1471-2105 (2009)).

Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la identidad de dos polipéptidos (por ejemplo, un péptido no modificado y una variante peptídica). Por ejemplo, puede calcularse la identidad después de alinear las dos secuencias de tal forma que la identidad se encuentra a su nivel más elevado. Puede llevarse a cabo otra forma de calcular la identidad mediante algoritmos publicados. Puede llevarse a cabo un alineamiento óptimo de secuencias para comparación mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Pueden obtenerse los mismos tipos de identidad para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos divulgados en Zuker, *Science* 244:48-52 (1989); Jaeger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-10 (1989); Jaeger et al., *Methods Enzymol.* 183:281-306 (1989). Se entiende que, normalmente, puede usarse cualquiera de los métodos y que, en determinados casos, los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la materia entiende que si se halla identidad con al menos uno de estos métodos, se dirá que las secuencias tienen la identidad indicada y que están divulgadas en el presente documento.

En algunos casos, tal como se describe en más detalle en la sección de métodos más adelante, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden producirse usando material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) aislado y/o purificado a partir de células inmunitarias (por ejemplo, células B, incluyendo células B de memoria) obtenidas usando los métodos divulgados en el presente documento. Una vez que se ha obtenido dicho material genético, se conocen en la técnica y/o se resumen más adelante métodos para usarlo y obtener las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento.

En algunos casos, los péptidos pueden incluir una etiqueta detectable. Tal como se usa en el presente documento, una "etiqueta" se refiere a un resto que tiene al menos un elemento, isótopo, o grupo funcional incorporado en el resto que posibilite la detección del péptido al que se une la etiqueta. Las etiquetas pueden unirse directamente (es decir, mediante un enlace) o pueden unirse mediante un enlazado (por ejemplo, tal como, por ejemplo, un alquileo cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; alquilenilo cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; alquileno cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; heteroalquileno cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; arileno sustituido o sin sustituir; heteroarileno sustituido o sin sustituir; o acileno sustituido o sin sustituir, o cualquier combinación de los mismos, que pueden formar un enlazador). Pueden unirse etiquetas a un péptido en cualquier posición que no interfiera con la actividad biológica o las características del polipéptido de la invención que se esté detectando.

Las etiquetas pueden incluir: etiquetas que contengan restos isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, incluyendo, pero sin limitación, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m), ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{169}Yb y ^{186}Re ; Etiquetas que incluyen restos inmunes o inmunorreactivos, que pueden ser anticuerpos o antígenos, que pueden estar unidos a enzimas (por ejemplo, tales como peroxidasa de rábano picante); etiquetas que están coloreadas, son luminiscentes, fosforescentes o incluyen restos fluorescentes (por ejemplo, tales como la etiqueta fluorescente FITC); etiquetas que tienen uno o más restos de fotoafinidad; etiquetas que tienen restos de ligando con uno o más compañeros de unión conocidos (tales como biotina-estreptavidina, FK506-FKBP, etc.).

En algunos casos, las etiquetas pueden incluir uno o más restos de fotoafinidad para la dilucidación directa de interacciones intermoleculares en sistemas biológicos. Puede emplearse diversos fotóforos conocidos, basándose la mayoría en la fotoconversión de compuestos diazo, azidas, o diazirinas en nitrenos o carbenos (véase, por ejemplo, Bayley, H., *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* (1983), Elsevier, Ámsterdam). En determinadas realizaciones de la invención, las etiquetas de fotoafinidad empleadas son o-, m- y p-azidobenzosilos, sustituidos con uno o más restos de halógeno, incluyendo, pero sin limitación, ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico.

Las etiquetas también pueden ser o servir como agentes para la obtención de imágenes. Los agentes para la obtención de imágenes a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, aquellos usados en tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (TAC), tomografía computarizada por emisión de fotones individuales, rayos X, fluoroscopia, y obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM); anti-eméticos; y agentes de contraste. Los agentes diagnósticos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, restos fluorescentes, restos luminiscentes, restos magnéticos; quelatos de gadolinio (por ejemplo, quelatos de gadolinio con DTPA, DTPA-BMA, DOTA y HP-DO3A), quelatos de hierro, quelatos de magnesio, quelatos de manganeso, quelatos de cobre, quelatos de cromo, materiales a base de yodo útiles para obtención de imágenes por TAC y rayos X, y radionúclidos. Los radionúclidos adecuados incluyen, pero sin limitación, ^{123}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{135}I , ^{47}Sc , ^{72}As , ^{72}Se , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{97}Ru , ^{100}Pd , ^{101}mRh , ^{119}Sb , ^{128}Ba , ^{197}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{77}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{32}P , ^{33}P y ^{18}F .

Los restos fluorescentes y luminiscentes incluyen, pero sin limitación, diversas moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas diferentes citadas comúnmente como "colorantes", "etiquetas" o "indicadores". Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, colorantes de acridina, colorantes Alexa, colorantes de cianina, etc. Los restos fluorescentes y luminiscentes pueden incluir diversas proteínas de origen natural y derivados de las mismas, por ejemplo, variantes modificadas por ingeniería genética. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes incluyen proteína fluorescente verde (GFP), GFP mejorada, proteínas fluorescentes rojas, amarillas, cian y zafiro, proteína fluorescente de coral de arrecife, etc. Las proteínas luminiscentes incluyen luciferasa, aequorina y derivados de las mismas. Se conocen en la técnica numerosos colorantes y proteínas fluorescentes y luminiscentes (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2004/0067503; Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications," John Wiley and Sons, 2002; y Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, 9ª edición, 2002).

El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a otras moléculas, por ejemplo, una molécula de polipéptido o de ácido nucleico que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos útiles en la invención son anticuerpos purificados los cuales han sido separados de uno o más componentes de su ambiente natural.

5 El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante proteico capaz de unirse a un anticuerpo. Los epítipos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros, pero no de los segundos, no se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

15 En el presente documento se describen secuencias de nucleótidos que se corresponden (por ejemplo, codifican) los péptidos divulgados (por ejemplo, divulgados en la tabla 1). Estas secuencias incluyen todas las secuencias degeneradas relacionadas con los péptidos divulgados, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica un péptido particular y variantes y derivados de los mismos. Por lo tanto, aunque no se haya plasmado por escrito cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento, se entiende que de hecho, todas y cada una de las secuencias se han divulgado y descrito en el presente documento mediante las secuencias de polipéptido divulgadas.

20 En algunos casos, los ácidos nucleicos divulgados pueden incluir vectores de expresión. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales, tales como BAC, YAC, o PAC, y vectores víricos.

25 Los vectores descritos en el presente documento también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable, por ejemplo, resistencia a antibióticos, a una célula. El producto marcador se usa para determinar si el vector ha sido suministrado a la célula y si una vez administrado se está expresando. Los ejemplos de marcadores de selección para células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, higromicina, puromicina, y blasticidina. Cuando se transfieren satisfactoriamente dichos marcadores de selección a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir en caso de que se le imponga una presión selectiva. Los ejemplos de otros marcadores incluyen, por ejemplo, el gen *lacZ* de *E. coli*, proteína fluorescente verde (GFP), y luciferasa. Además, un vector de expresión puede comprender una secuencia de etiquetado diseñada para facilitar la manipulación o la detección (por ejemplo, la purificación o la localización) del polipéptido expresado. Las secuencias de etiquetado, tales como las secuencias de GFP, glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o la etiqueta FLAG™ (Kodak; New Haven, CT) se expresan normalmente en forma de una fusión con el polipéptido codificado. Dichas etiquetas pueden insertarse en cualquier parte dentro del polipéptido, incluyendo en cualquiera de los extremos carboxilo o amino.

40 En el presente documento se describen células que comprenden los ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores) y/o péptidos divulgados en el presente documento. Las células pueden incluir, por ejemplo, células eucariotas y/o procariontas. En general, las células que pueden usarse en el presente documento están disponibles comercialmente en, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108. Véase también F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1998). Los métodos de transformación y transfección útiles para generar las células divulgadas en el presente documento se describen, por ejemplo, en F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1998).

50 **Formulaciones farmacéuticas**

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, fármacos, y/o agentes usados para el tratamiento del cáncer. Dichos compuestos, fármacos, y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, fármacos para quimioterapia, fármacos de molécula pequeña o anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria frente a un cáncer determinado. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más péptidos divulgados en el presente documento y uno o más de un anticuerpo o péptido anti-CTLA-4, un anticuerpo o péptido anti-PD-1, y/o un anticuerpo o péptido anti-PDL-1. Por ejemplo, en algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden combinarse con uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o menos de diez) compuestos.

60 En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, incluyendo inhibidores de histona desacetilasa ("HDAC"). Los ejemplos de inhibidores de HDAC incluyen, por ejemplo, ácido hidroxámico, Vorinostat (Zolinza); ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)(Merck), tricoastatina A (TSA), LAQ824 (Novartis), Panobinostat (LBH589) (Novartis), Belinostat (PXD101) (CuraGen), ITF2357 Italfarmaco SpA (Cinisello), tetrapéptido cíclico; Depsipéptido (romidepsina, FK228) (Gloucester Pharmaceuticals), Benzamida; Entinostat (SNDX-275/MS-275) (Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103 (Celgene), ácidos alifáticos de cadena corta, ácido valproico, butirato de fenilo, AN-9, pivanex (Titan Pharmaceutical), CHR-3996 (Chroma

Therapeutics), y CHR-2845 (Chroma Therapeutics).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, incluyendo inhibidores del proteasoma, incluyendo, por ejemplo, Bortezomib, (Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals), Carfilzomib (PR-171) (Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770, y MLN9708

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir agentes alquilantes, tales como melfalano e inhibidores de topoisomerasa, tales como adriamicina (doxorubicina), que se ha demostrado que aumentan la expresión de MICA, que podrían mejorar la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-MICA.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden formularse para su uso como o en composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones pueden formularse o adaptarse para su administración a un sujeto por cualquier vía, por ejemplo, cualquier vía aprobada por la Food and Drug Administration (Agencia para los Alimentos y los Fármacos, por sus siglas en inglés). Se describen métodos ilustrativos en el manual CDER Data Standards de la FDA, versión número 004 (que está disponible en fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm).

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más péptidos. Las expresiones "cantidad eficaz" y "eficaz para tratar", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o a una concentración de uno o más péptidos durante un periodo de tiempo (incluyendo la administración aguda o crónica y la administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para provocar un efecto o un resultado fisiológico previsto.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más péptidos y cualquier portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, los agentes farmacéuticos pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos adicionales en cantidades eficaces para lograr una modulación de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad.

La expresión "portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o adyuvante que pueda administrarse a un paciente, junto con un péptido descrito en el presente documento, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y que no sea tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del compuesto.

Los transportadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de suministro de fármaco auto-emulsionantes (SEDDS), tales como succinato de D- α -tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéutica, tales como los Tween u otras matrices de suministro poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tamponadoras como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogeno fosfato de disodio, hidrogeno fosfato de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina. También pueden usarse ventajosamente ciclodextrinas, tales como I-, β - y K- ciclodextrina, para mejorar el suministro de compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener cualquier portador, vehículo o adyuvante no tóxico y farmacéuticamente aceptable convencional. En algunos casos, puede ajustarse el pH de la formulación con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o de su forma de suministro. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una solución o polvo para inhalación y/o administración nasal. Dichas composiciones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la especialidad usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites fijos estériles, se usan convencionalmente en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de triglicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de colza, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también

5 pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, tales como emulsiones y/o suspensiones. Pueden usarse otros tensioactivos comunes, tales como los Tween o Span y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares que se emplean comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo, con fines de formulación.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones y/o emulsiones acuosas, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa que se combina con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

15 Como alternativa o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante un aerosol nasal o por inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas de sobra conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonados, y/u otros agentes solublizantes o de dispersión conocidos en la técnica.

20 En el presente documento se describen métodos para usar uno cualquiera o más de los péptidos o de las composiciones farmacéuticas (indicadas más adelante como X) divulgadas en el presente documento en los siguientes métodos:

25 Sustancia X para su uso como medicamento en el tratamiento de una o más enfermedades o afecciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, citadas en los siguientes ejemplos como "Y"). Uso de la sustancia X para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Y; y la sustancia X para su uso en el tratamiento de Y.

30 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden formularse para su comercialización en los Estados Unidos, su importación en los Estados Unidos, y/o exportación desde los Estados Unidos.

Métodos

35 En algunos casos, los métodos pueden incluir la selección de un sujeto humano que tiene o ha tenido una afección o enfermedad y que muestra o ha mostrado una respuesta inmunitaria positiva frente a la afección o enfermedad. En algunos casos, los sujetos adecuados incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen o han tenido una afección o enfermedad pero que han superado la enfermedad o un aspecto de la misma, presentan síntomas reducidos de la enfermedad (por ejemplo, en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad), y/o que sobreviven durante periodos de tiempo prolongados con la afección o enfermedad (por ejemplo, en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad), por ejemplo, en un estado asintomático (por ejemplo, en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad). En algunos casos, pueden seleccionarse los sujetos en caso de que hayan sido vacunados (por ejemplo, vacunados previamente y/o vacunados y re-vacunados (por ejemplo, haber recibido una vacuna de refuerzo)) contra una afección o enfermedad.

50 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal. En algunos casos, el sujeto es un mamífero. En algunos casos, el término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ser humano (por ejemplo, un hombre, una mujer, o un niño). Las muestras para su uso en los métodos pueden incluir muestras de suero, por ejemplo, obtenidas del sujeto seleccionado.

55 En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir obtener una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto candidato) y ensayar la muestra respecto de una indicación de que el sujeto es adecuado para su selección. En algunos casos, puede confirmarse o identificarse, por ejemplo, por un profesional sanitario, que el sujeto ha tenido o tiene una afección o enfermedad. En algunos casos, la prueba de una respuesta inmune positiva frente a una afección o enfermedad puede obtenerse a partir de registros del paciente, el historial familiar, y/o detectando una indicación de una respuesta inmune positiva. En algunos casos, pueden estar implicadas múltiples partes en la selección del sujeto. Por ejemplo, una primera parte puede obtener una muestra de un sujeto candidato y una segunda parte puede ensayar la muestra. En algunos casos, los sujetos pueden seleccionarse y/o remitirse por un profesional médico (por ejemplo, un médico de cabecera). En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir obtener una muestra de un sujeto seleccionado y almacenar la muestra y/o usarla en los métodos divulgados en el presente documento. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, células o poblaciones de células.

65 En algunos casos, la obtención o el uso como diana de las células inmunes puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo: obtener o proporcionar un inmunógeno tetramérico que pueda unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana; poner en contacto el inmunógeno tetramérico con una

muestra; detectar el inmunógeno tetramérico; determinar si el inmunógeno tetramérico está unido a una célula inmune diana; y, en caso de que el inmunógeno tetramérico esté unido a una célula inmune diana, obtener la célula inmune diana.

5 Los inmunógenos tetraméricos pueden incluir inmunógenos relacionados con una afección o enfermedad y/o que se unan (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana, por ejemplo, en el que la célula inmune diana está relacionada con una afección o enfermedad relacionada. Los inmunógenos y las células inmunes diana relacionadas con una afección o enfermedad incluyen, por ejemplo, inmunógenos o células inmunes presentes en sujetos con una determinada afección o enfermedad, pero no en sujetos sin la afección o enfermedad; y/o

10 inmunógenos o células inmunes presentes a niveles alterados (por ejemplo, aumentados) en sujetos con una afección o enfermedad determinada en relación con sujetos sin la afección o enfermedad. En algunos casos, los inmunógenos o las células inmunes pueden ser específicas del cáncer. Los inmunógenos pueden ser solubles. El inmunógeno tetramérico puede incluir un inmunógeno tetramérico (por ejemplo, antígeno y/o epítipo) (incluyendo, por ejemplo, antígeno monomérico, dimérico y/o trimérico tetramerizado). En algunos casos, un inmunógeno tetramérico tiene unión aumentada a una célula en relación con el nivel de unión entre una forma no tetramérica del inmunógeno a la célula en condiciones similares. En algunos casos, un antígeno tetramérico incluye un resto detectable, por ejemplo, un resto de estreptavidina. Se conocen en la técnica y se divulgan en el presente documento métodos de tetramerización.

20 Puede efectuarse la detección del inmunógeno tetramérico y/o la determinación de si el inmunógeno tetramérico está unido a una célula diana usando métodos conocidos en la técnica y/o divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los métodos pueden incluir citometría de flujo. Se conocen en la técnica y/o se divulgan en el presente documento métodos de optimización para citometría de flujo, incluyendo métodos de clasificación y selección. En algunos casos, los métodos pueden incluir el análisis del nivel de unión, afinidad de unión, y/o especificidad de unión

25 entre un inmunógeno tetramérico unido a una célula inmune diana. Por ejemplo, puede obtenerse una célula inmune diana en caso de que (por ejemplo, solo en caso de que) se determine un nivel predeterminado de unión entre un inmunógeno tetramérico y una célula inmune diana. Los niveles predeterminados de unión pueden ser niveles específicos y/o pueden ser niveles relativos. La obtención de células inmune diana puede incluir obtener, proporcionar, identificar, seleccionar, purificar, y/o aislar las células inmune diana. Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, métodos de clasificación celular, enriquecimiento celular, y/o reducción de fondo.

En algunos casos, la obtención de células inmunes dirigidas contra un autoantígeno puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, identificar un sujeto que muestra una respuesta inmune positiva hacia el autoantígeno; obtener o proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

35

En algunos casos, los métodos pueden incluir obtener células inmunes dirigidas contra un autoantígeno de un paciente de cáncer, pueden incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, identificar un sujeto que muestra una respuesta inmune positiva hacia el autoantígeno; proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

40

Las formas multiméricas de un autoantígeno pueden incluir autoantígenos relacionados con una afección o enfermedad y/o que se unen (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana, por ejemplo, en el que la célula inmune diana está relacionada con una afección o enfermedad relacionada. Los autoantígenos y las células inmunes diana relacionadas con una afección o enfermedad incluyen, por ejemplo, antígenos o células inmunes presentes en sujetos con una determinada afección o enfermedad, pero no en sujetos sin la afección o enfermedad; y/o inmunógenos o células inmunes presentes a niveles alterados (por ejemplo, aumentados) en sujetos con una afección o enfermedad determinada en relación con sujetos sin la afección o enfermedad. En algunos casos, la afección o enfermedad puede ser un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y colon, linfoma o leucemia. En algunos casos, los autoantígenos o las células inmunes pueden ser específicos del cáncer. Los autoantígenos pueden ser solubles. La forma multimérica del autoantígeno puede incluir una forma tetramérica (incluyendo, por ejemplo, antígeno monomérico, dimérico y/o trimérico tetramerizado) del autoantígeno (por ejemplo, antígeno y/o epítipo). En algunos casos, una forma multimérica del autoantígeno incluye un resto detectable, por ejemplo, un resto de estreptavidina. Se conocen en la técnica y se divulgan en el presente documento métodos de multimerización.

45

50

55

Se conocen en la técnica y se ilustran en el presente documento métodos para aislar o purificar material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) a partir de la célula inmune diana obtenida. Una vez que se ha obtenido dicho material genético, se conocen en la técnica y/o se resumen más adelante métodos para usarlo y obtener las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento. Tal como se ha discutido anteriormente, puede modificarse el material genético, usando técnicas conocidas en la especialidad para crear las variantes peptídicas divulgadas en el presente documento.

60

65

La generación de péptidos a partir de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc) contenidos en u obtenidos a partir de la

célula diana puede incluir, por ejemplo, análisis, por ejemplo, secuenciación de dominios variables de cadena pesada y ligera de células inmunes diana (por ejemplo, células inmunes diana identificadas individuales o aisladas). En algunos casos, los métodos pueden incluir la generación de anticuerpos completamente humanos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, tal como se ha divulgado anteriormente), y la humanización de anticuerpos no humanos. El ADN puede aislarse y/o secuenciarse fácilmente a partir de las células inmunes obtenidas usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos).

Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células de *Escherichia coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen, Skerra et al., Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

La expresión recombinante de un anticuerpo o una variante del mismo requiere generalmente de la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Por lo tanto, en el presente documento se describen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.981.216; 5.591.639; 5.658.759 y 5.122.464) y puede clonarse el dominio variable del anticuerpo en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o ambas de las cadenas pesada y ligera completas.

Una vez que se ha transferido el vector de expresión a una célula hospedadora por técnicas convencionales, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, en el presente documento se describen células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo según la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera de la misma, o a una porción de la misma, o un anticuerpo monocatenario según la invención, unido operativamente a un promotor heterólogo. En determinadas realizaciones, para la expresión de anticuerpos de doble cadena, pueden expresarse conjuntamente vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla a continuación.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión de anticuerpos recombinantes e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humanas (por ejemplo, Hep G2), células epiteliales de riñón humanas 293, y una serie de líneas celulares diferentes. Las diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares adecuadas para asegurar una correcta modificación y procesamiento del anticuerpo o la porción del mismo expresada. Para este fin, pueden usarse células eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena cadenas de inmunoglobulina funcionales), SP20, CRL7030 y HsS78Bst. En una realización, pueden usarse líneas celulares humanas desarrolladas mediante la inmortalización de linfocitos humanos para producir de manera recombinante anticuerpos monoclonales. En una realización, puede usarse la línea celular PER.C6. (Crucell, Países Bajos) para producir de manera recombinante anticuerpos monoclonales.

En algunos casos, los péptidos divulgados en el presente documento pueden generarse de manera sintética. Se conocen en la técnica metodologías de transformaciones de química sintética y de grupo protector (protección y desprotección) útiles para sintetizar péptidos descritos en el presente documento e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Green y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de los mismos.

También pueden producirse péptidos por métodos de síntesis química, que son de sobra conocidos para un experto habitual en la materia. Véase, por ejemplo, Fields et al., capítulo 3 en Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., Nueva York, N.Y., 1992, pág. 77. Por lo tanto, pueden sintetizarse péptidos usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el α -NH₂ protegido mediante química de t-Boc o Fmoc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems, modelo 430A o 431.

Un modo para producir los péptidos descritos en el presente documento es el uso de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido C-terminal se une a una resina de poliestireno reticulada mediante un enlace lábil a ácidos con una molécula enlazadora. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para la síntesis, haciendo que sea relativamente sencilla y rápida la eliminación por lavado del exceso de reactivos y subproductos. El extremo N-terminal se protege con el grupo Fmoc, que es estable en ácidos, pero que puede retirarse con una base. Cualquier grupo funcional de cadena lateral queda protegido con grupos estables en bases y lábiles en ácidos.

Pueden producirse péptidos más largos uniendo péptidos sintéticos individuales usando ligadura química nativa. Como alternativa, los péptidos sintéticos más largos pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante de sobra conocidas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales convencionales conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido descrito en el presente documento, se retrotraduce la secuencia de aminoácidos para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que se va a expresar el gen. A continuación, se produce un gen sintético, normalmente sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, en caso necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula hospedadora. Después, el péptido se expresa en condiciones ideales adecuadas para el sistema de expresión y el hospedador seleccionados. El péptido se purifica y caracteriza por métodos convencionales.

Los péptidos pueden producirse de un modo combinatorio de alto rendimiento, por ejemplo, usando un sintetizador combinatorio multicanal de alto rendimiento disponible en Advanced Chemtech.

Pueden reemplazarse los enlaces peptídicos, por ejemplo, para aumentar la estabilidad fisiológica del péptido, por: un enlace retro-inverso (C(O)-NH); un enlace de amida reducida (NH-CH₂); un enlace de tiometileno (S-CH₂ o CH₂-S); un enlace de oxometileno (O-CH₂ o CH₂-O); un enlace de etileno (CH₂-CH₂); un enlace de tioamida (C(S)-NH); un enlace de trans-olefina (CH=CH); un enlace de trans-olefina sustituido con flúor (CF=CH); un enlace de cetometileno (C(O)-CHR) o CHR-C(O) en el que R es H o CH₃; y un enlace de fluorocetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O) donde R es H o F o CH₃).

Los péptidos pueden modificarse además mediante: acetilación, amidación, biotilación, cinamoilación, farnesilación, fluoresceinación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación y sulfurilación. Tal como se indica anteriormente, los péptidos pueden conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, grupos alquilo lineales o ramificados C1-C20); radicales de ácido graso; y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, los péptidos pueden purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, en particular por afinidad respecto de los antígenos específicos, proteína A o proteína G, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos útiles en la presente invención o los fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas (citadas en el presente documento como "etiquetas") descritas anteriormente o de otro modo conocidas en la técnica para facilitar la purificación.

En la FIG. 21 se muestra una revisión a modo de ejemplo no limitante de los métodos. No se indica un orden.

Métodos de uso

En el presente documento se describen métodos de tratamiento que incluyen administrar a un sujeto una composición divulgada en el presente documento.

En el presente documento se describen métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o los síntomas del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un péptido que se une inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA), en los que el péptido comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer asociado a la sobreexpresión de MICA. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o una afección pre-neoplásica de células plasmáticas. En algunas realizaciones, se ha diagnosticado que el sujeto padece un cáncer o que tiene predisposición al cáncer.

En el presente documento se describen métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un anticuerpo aislado que se une específicamente a la secuencia A relacionada con el polipéptido del

CMH de clase I (MICA), en los que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la CDR1 de VH, la CDR2 de VH, y la CDR3 de VH tal como se muestran en la secuencia de VH de las SEQ ID NO: 11, 149, 168, 186, o 204 y una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 4, 151, 170, 189, o 206.

5 En el presente documento también se describen métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que se une inmunoespecíficamente a angiopoyetina, en los que el péptido comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la VH del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, y la CDR3 de la VL del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 mostrada en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer asociado a la sobreexpresión de MICA. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o una afección pre-neoplásica de células plasmáticas. En algunas realizaciones, se ha diagnosticado que el sujeto padece un cáncer o que tiene predisposición al cáncer.

20 En el presente documento se describen métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un anticuerpo aislado que se une específicamente a angiopoyetina (por ejemplo, angiopoyetina-2), en los que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la CDR1 de VH, la CDR2 de VH, y la CDR3 de VH tal como se muestran en la secuencia de VH de las SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, 222 y una secuencia de región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83, o 224.

25 Los síntomas del cáncer son de sobra conocidos por los expertos en la materia e incluyen, sin limitación, características de lunares inusuales, un cambio en la apariencia de un lunar, incluyendo asimetría, borde, color y/o diámetro, una zona de la piel recientemente pigmentada, un lunar anormal, un área oscurecida debajo de las uñas, bultos mamarios, cambios en el pezón, quistes mamarios, dolor mamario, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para comer, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la falta de aliento, tos con sangre, 30 sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares, metástasis óseas, plenitud abdominal, hinchamiento, fluido en la cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómito sanguinolento, sudoración excesiva, fiebre, presión sanguínea elevada, anemia, diarrea, ictericia, mareo, escalofríos, espasmos musculares, metástasis de colon, metástasis pulmonares, metástasis de vejiga, metástasis hepáticas, metástasis óseas, 35 metástasis de riñón, y metástasis pancreáticas, dificultad para tragar, y similares.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden aplicarse a una gran variedad de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas, ciervos, alces, 40 cabras, perros, gatos, mustélidos, conejos, cobayas, hámsteres, ratas, y ratones.

Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar, inhibir, mejorar y/o mitigar completa o parcialmente la enfermedad o afección que padece el sujeto. En algunos casos, el tratamiento puede dar como resultado la ausencia continuada de la enfermedad o afección que padece el sujeto.

45 En general, los métodos incluyen seleccionar a un sujeto en riesgo de o con una enfermedad o afección. En algunos casos, puede tratarse la afección o enfermedad del sujeto con una composición farmacéutica divulgada en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos incluyen seleccionar a un sujeto con cáncer, por ejemplo, en los que el cáncer del sujeto puede tratarse usando como diana uno o más de MICA y/o angiopoyetina-2.

50 En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir una sola administración, múltiples administraciones, y administración repetida, según sea necesario, para el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad o afección que padezca el sujeto. En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir evaluar un nivel de enfermedad en el sujeto antes del tratamiento, durante el tratamiento, y/o después del tratamiento. En algunos casos, el tratamiento puede continuarse hasta que se detecta una reducción en el nivel de la enfermedad en el sujeto.

55 Los términos "administrar" o "administración", tal como se usan en el presente documento, se refieren a implantar, absorber, ingerir, inyectar, o inhalar, el péptido de la invención (es decir, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo), independientemente de su forma. En algunos casos, pueden administrarse por vía tópica (por ejemplo, por vía nasal) y/o por vía oral uno o más de los péptidos divulgados en el presente documento a un sujeto. Por ejemplo, los 60 métodos en el presente documento incluyen la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición de compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. La dosificación específica y las pautas de tratamiento para cualquier paciente concreto dependen de varios factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, afección o síntomas, 65 la disposición del paciente hacia la enfermedad, afección o síntomas, y el criterio del médico a cargo del tratamiento.

Después de la administración, puede evaluarse al sujeto para detectar, evaluar, o determinar su nivel de enfermedad. En algunos casos, el tratamiento puede continuarse hasta que se detecta un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de la enfermedad en el sujeto.

- 5 Tras la mejora del estado de un paciente (por ejemplo, un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de enfermedad en el sujeto), puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención, en caso necesario. Posteriormente, pueden reducirse la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga la mejora del estado. Sin embargo, los pacientes pueden necesitar un tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los
- 10 síntomas de enfermedad.

En el presente documento se describen métodos para detectar células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria de un sujeto humano. Pueden usarse dichos métodos, por ejemplo, para controlar los niveles de células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, en un sujeto humano, por ejemplo,

15 después de un acontecimiento. Los acontecimientos pueden incluir, pero sin limitación, detección de enfermedades, infección; administración de una composición terapéutica divulgada en el presente documento, administración de un agente terapéutico o de un régimen de tratamiento, administración de una vacuna, inducción de una respuesta inmune. Dichos métodos pueden usarse clínicamente o para investigación.

20 Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

- 25 En el presente documento se describen métodos que permiten una detección sensible, específica y fiable de células B de memoria escasas, con especificidad de antígeno definida, a partir de cantidades limitadas de sangre periférica. Los métodos permitieron la visualización y el aislamiento de células B de memoria de meses a años después de que se hubiese eliminado el antígeno.

- 30 La prueba de principio para los métodos divulgados en el presente documento se estableció usando tetrámeros del fragmento C del toxoide tetánico (TTCF), tal como se comunica en detalle en Franz et al. (Blood, 118(2):348-357 (2011)).

Se seleccionó TTCF (es decir, el fragmento C-terminal no tóxico de 52 kDa de TTCF) como antígeno modelo debido a que la mayoría de los individuos han sido vacunados con toxoide tetánico y se inducen títulos de anticuerpo IgG persistentes por la vacuna (Amanna et al., N. Engl. J. Med., 357:1903-1915, 2007). Por consiguiente, el uso de TTCF proporcionó un gran número de sujetos en los que podían verificarse los métodos divulgados en el presente documento. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los presentes métodos pueden adaptarse para que incluyan cualquier antígeno relacionado con enfermedades usando las capacidades rutinarias. Tal como se

40 demuestra en los ejemplos a continuación, dicha adaptación ha sido demostrada mediante la adquisición de anticuerpos dirigidos contra MICA y angiopoyetina-2, que son antígenos relacionados con el cáncer.

Ejemplo 1: Expresión de antígeno y formación de tetrámero

45 Tal como se describe en más detalle a continuación, se expresó TTCF en *Escherichia coli* y se unió un sitio BirA al extremo N-terminal para la mono-biotinilación de sitio específico mediante la enzima BirA. Se dispuso un enlazador flexible entre la proteína y el sitio de biotinilación para prevenir la impedancia estérica de la unión del anticuerpo. Se purificó TTCF mediante cromatografía de intercambio aniónico, se biotiniló con BirA, y se separó de la biotina libre y de BirA mediante cromatografía de filtración en gel. Se generaron tetrámeros de TTCF mediante la incubación de

50 estreptavidina marcada fluorescentemente con antígeno TTCF biotinilado a una relación molar de 1:4. Estos tetrámeros se usaron junto con un panel de mAb para la identificación de células B de memoria específicas para el toxoide tetánico.

Se clonó TTCF en pET-15b (Novagen). Se indujo la expresión de proteínas en *Escherichia coli* BL21(DE3) con β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo 1 mM (IPTG) durante 4 horas a 28°C. Se lavaron las células, se lisaron, y se recogió el sobrenadante resultante. Se purificó TTCF usando una columna de afinidad HIS-Select (Sigma). La etiqueta de His se retiró proteolíticamente. El dominio proximal de membrana de CD80 se produjo usando métodos similares. Las proteínas se mono-biotinilaron. Para determinados experimentos, se unieron moléculas de colorante Alexa-488 (Molecular Probes) a aminas primarias en TTCF o CD80 biotinilado.

60

Se prepararon tetrámeros de antígeno incubando el antígeno biotinilado con estreptavidina etiquetada con PE de categoría superior (Molecular Probes) durante al menos 20 minutos sobre hielo a una relación molar de 4:1. Antes de su uso, se centrifugaron las preparaciones de tetrámero para retirar los agregados. En algunos experimentos, se formaron tetrámeros con antígenos etiquetados con Alexa-flúor-488 y estreptavidina no fluorescente a una relación

65 4:1.

Ejemplo 2: Métodos de identificación

Se llevaron a cabo métodos tal como se describe en Franz et al., Blood, 118(2):348-357 (2011).

- 5 Las células se clasificaron en un clasificador celular BD FACS Aria II. Las células se clasificaron en células individuales. En primer lugar, se separaron las muestras para células CD19⁺ que eran negativas para un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD14, CD16, 7AAD) y después se separaron en plasmablastos, identificados por altos niveles de CD27 y un nivel intermedio de expresión de CD 19, y finalmente en células tetrámero⁺ CD19⁺.
- 10 Debido a la baja frecuencia de células B de memoria, fue necesario reducir cuidadosamente el fondo tanto como fuese posible. En primer lugar, se enriquecieron las células B por selección negativa (cóctel de anticuerpos para CD2, CD3, CD14, CD16, CD56 y glicoforina A) para retirar la mayoría de las células que podrían unirse de manera no específica al tetrámero. Las células enriquecidas se separaron a partes iguales y se tiñeron con TTCF o un tetrámero de control seguido de marcado con CD19, CD27 e IgM para seleccionar de manera específica células B
- 15 de memoria con la clase cambiada. La estrategia de clasificación tuvo en consideración la expresión de CD 19, la ausencia de marcado con un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD 14, CD16, 7AAD), la expresión del marcador de memoria CD27 y la ausencia de expresión de IgM como prueba del cambio de clase. Se representó gráficamente la tinción de tetrámero frente a la tinción de CD27 para la visualización de las células B de memoria con la especificidad de antígeno de interés. Las células B positivas a tetrámero se clasificaron directamente en tiras
- 20 de PCR que contenían 3 µl de tampón de extracción de ARNm.

Los tubos se mantuvieron en frío durante la clasificación y las células clasificadas se congelaron y almacenaron a -80 °C. Como controles positivos, se usaron células B CD19⁺ CD27⁺ IgM⁻.

- 25 Se usó un protocolo de PCR anidada comunicado previamente para amplificar los segmentos variables de cadena pesada y ligera (Wang et al., J. Immunol. Methods., 244:217-225, 2000). La amplificación del ARNm se llevó a cabo en condiciones adecuadas para minimizar la contaminación. Los cebadores usados incluyeron:

- 30 TAATACGACTCACTATAGGTTCCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG(SEQ ID NO: 91);
 TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC(SEQ ID NO: 92);
 TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEQ ID NO: 93).

La PCR anidada se llevó a cabo tal como se describe en Franz et al., Blood, 118(2):348-357(2011).

- 35 Se incluyeron controles negativos para controlar y proteger frente a la contaminación. A partir de un total de 35 células individuales marcadas con el tetrámero de TTCF, se amplificaron 32 segmentos de cadena pesada y 30 de cadena ligera y se secuenciaron directamente a partir de los productos de la PCR purificados en gel, correspondiente a una eficacia general de la PCR del 89 %. El análisis de secuencia reveló que las células tetrámero de TTCF⁺ emplearon diversos segmentos génicos V_HD-J_H diferentes, sin dominancia de un segmento génico
- 40 concreto. Las secuencias observadas apoyaron que los clones representaron células diversificadas por hipermutación somática.

- La producción y purificación de anticuerpo incluyó la clonación de ADN de dominio variable de cadena pesada y ligera en vectores de expresión pcDNA3.3 separados que contenían la secuencia de péptido de señal de prolactina bovina así como dominios constante de cadena pesada o kappa ligera de IgG de longitud completa. Los anticuerpos se expresaron en medio para CHO-S (Invitrogen) complementado con Glutamax 8 mM (Gibco) en matraces de agitación de 100 ml a 37 °C con CO₂ al 8 %. Un día antes de la transfección, las células se separaron a razón de 6x10⁵ células/ml. En el día de la transfección, se ajustaron las células, en caso necesario, a 1x10⁶ células/ml. Se cotransfectaron 25 µg de ADN de plásmido de cadena pesada y ligera usando reactivo de transfección MAX
- 50 (Invitrogen) y se cultivaron durante 6-8 días las células transfectadas. La proteína se obtuvo usando perlas de Proteína G sefarosa y se eluyó el anticuerpo usando glicina 100 mM, pH 2,5 y se separaron de las perlas usando tubos para centrifugación Spin-X. El anticuerpo purificado se cambió a suero salino tamponado con fosfato (PBS) usando columnas Micro Bio-Spin (BioRad). La concentración de proteína se evaluó mediante absorbancia a 280 nm.

- 55 Para el ensayo de saturación de unión, se marcó con europio TTCF no biotinilado purificado con MonoQ y se retiró el europio libre. Se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos durante una noche con 20 ng de anticuerpo por pocillo en tampón de NaHCO₃ 100 mM a pH 9,6. El bloqueo se efectuó con tampón de ensayo complementado con seroalbúmina bovina (BSA) y gamma globulinas bovinas. Se diluyó TTCF-europio en tampón de ensayo (100 nM a 4 pM) y se añadieron 200 µl por pocillo por triplicado. Se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C y se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 20 µM, Tween al 0,05 %). Se añadieron 100 µl de solución potenciadora a cada pocillo y se midieron las cuentas de fluorescencia usando un lector de placas Victor³ a 615 nm.
- 60

- Se analizaron secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera usando IMGT/V-Quest y el programa informático JIONSOLVER. Los datos de citometría de flujo se evaluaron usando el programa de análisis FlowJo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa informático GraphPad Prism 5 usando la prueba de la t
- 65

desemparejada. Para determinar los valores de K_D , se ajustaron los datos de unión en saturación usando el programa informático GraphPad Prism 5 usando análisis de regresión no lineal.

Ejemplo 3: La multimerización mejora la identificación de células B de memoria

5 Se compararon TTCF tetramérico y monomérico. El TTCF se etiquetó fluorescentemente con Alexa-488 y después se usó en forma monomérica o se convirtió en un tetrámero usando estreptavidina sin marcar (véase lo anterior). Las células B enriquecidas se incubaron con TTCF-Alexa-488 tetramérico o monomérico a la misma concentración. La proteína de control (dominio proximal de membrana de CD80) se etiquetó del mismo modo y también se usó en forma de tetrámero.

10 Tal como se muestra en las FIG. 22A y 22B, TTCF marcó a algunas células B de memoria, pero las frecuencias identificadas con el tetrámero fueron sustancialmente mayores (1,6-7,3 veces) usando células de tres donantes. En uno de los tres donantes, las células B de memoria específicas de TTCF pudieron detectarse con el tetrámero pero no con el monómero.

15 Estos resultados demuestran que los tetrámeros de antígeno permiten la detección sensible de células B de memoria basándose en la especificidad de antígeno de su BCR, a pesar de que dichas células son muy escasas en sangre periférica. Las células B de memoria con clase cambiada específicas para TTCF se marcaron brillantemente con el antígeno TTCF tetramérico adecuado, mientras que el etiquetado de fondo con tetrámero de control fue consistentemente bajo.

Ejemplo 4: Método/validación de anticuerpo

25 Se generaron anticuerpos completamente humanos uniendo regiones constantes de cadenas pesada y kappa de IgG a segmentos variables aislados mediante PCR solapante. Los anticuerpos se expresaron en un sistema de expresión de mamífero transitorio sin suero usando células CHO-S durante un periodo de 6-8 días. Los anticuerpos se purificaron usando proteína G y cromatografía de filtración en gel.

30 Tal como se muestra en la FIG. 23, los anticuerpos aislados de plasmablastos específicos para TTF mostraron elevadas afinidades de unión al antígeno TTCF, con una K_D de 2,2 nM (TTCF Ab 1) y 323 pM (TTCF Ab 2) (FIG. 23B). Los anticuerpos aislados de células B de memoria también mostraron elevadas afinidades de unión, con una K_D de 382 pM, 228 pM, y 1,4 nM, para otros anticuerpos (TTCF Ab 3, 4, y 5) (FIG. 23B).

35 Estos datos apoyan la especificidad de los métodos divulgados en el presente documento. Además, se demostró la especificidad de los métodos del presente documento mediante la construcción de cinco anticuerpos anti-TTCF a partir de tres donantes diferentes, todos los cuales se unieron a TTCF con afinidades elevadas.

40 Los datos del presente documento demuestran que los tetrámeros de antígeno posibilitan una detección sensible de células B de memoria después de la eliminación del antígeno del hospedador.

Ejemplo 5: Obtención de anticuerpos anti-MICA

45 Se desarrollaron anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a MICA usando los métodos del presente documento.

50 En resumen, se expresó el antígeno MICA (UniGene Hs.130838) con una etiqueta de BirA C-terminal (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 238)), que posibilita la mono-biotinilación del antígeno. El antígeno se tetramerizó con estreptavidina (SA) marcada con R-ficoeritrina (PE) a una relación molar de 4 MICA: 1 SA. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con melanoma en estadio avanzado que habían sido vacunados con células tumorales autólogas transducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006), y posteriormente se trataron con el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ipilimumab (YERVOY™ (disponible de Bristol Myers Squibb)). Se descongelaron rápidamente las células mononucleares de sangre periférica, se lavaron y se resuspendieron a 5×10^6 en suero salino taponado con fosfato (pH 7,2) complementado con suero fetal de ternero al 2 % y se tiñeron con aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de tetrámero durante 30 minutos sobre hielo. Se añadieron anticuerpos para identificar células B de memoria con la clase cambiada (CD19⁺, CD27⁺ e IgM⁺). Se incluyó un panel de anticuerpos de exclusión que etiquetan a células T, linfocitos citotóxicos naturales, macrófagos y células muertas para reducir la tinción de tetrámero de fondo (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Las células B individuales que se unieron al tetrámero MICA se clasificaron en tiras para PCR de 8 tubos usando el BD FACS Aria II. Se amplificó el ARNm del receptor de células B (BCR) usando un kit comercial de Epicentre Biotechnologies (número de catálogo: MBCL90310) usando los cebadores específicos de genes mostrados a continuación:

Amplificación del ARNm

65 IgG-T7: AATACGACTCACTATAGGTTCTGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG (SEQ ID NO: 94)
Kappa-T7:

TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC (SEQ ID NO: 95)

Lambda-T7:

TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEQ ID NO: 96)

PCR Uno

- 5
 VHL-1: TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA (SEQ ID NO: 97)
 VHL-2: CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO: 98)
 VHL-3: TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC (SEQ ID NO: 99)
 VHL-4: AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO: 100)
 10
 VHL-5: ATGGGGTCAACCGCCATCCT (SEQ ID NO: 101)
 VHL-6: ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT (SEQ ID NO: 102)
 Vkl-1: GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG (SEQ ID NO: 103)
 Vkl-2: CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEQ ID NO: 104)
 Vkl-3: TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC (SEQ ID NO: 105)
 15
 Vkl-4: CAGACCCAGGTCTTCATTTCT (SEQ ID NO: 106)
 V1L-1: CCTCTCCTCCTCACCCCTCCT (SEQ ID NO: 107)
 V1L-2: CTCCTCACTCAGGGCACA (SEQ ID NO: 108)
 V1L-3: ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC (SEQ ID NO: 109)
 CgII: GCCAGGGGGAAGAC(C/G)GATG (SEQ ID NO: 110)
 20
 CkII: TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG (SEQ ID NO: 111)
 CIII: AGCTCCTCAGAGGAGGG(C/T)GG (SEQ ID NO: 112)

PCR Dos

- 25
 VH-1: CAGGT(G/C)CAGCTGGT(G/A)CAGTC (SEQ ID NO: 113)
 VH-2: CAG(A/G)TCACCTTGAAGGAGTC (SEQ ID NO: 114)
 VH-3: (G/C)AGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 115)
 VH-4: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 116)
 VH-5: GA(G/A)GTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 117)
 30
 VH-6: CAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO: 118)
 Vk-1: CG(A/C)CATCC(A/G)G(A/T)TGACCCAGT (SEQ ID NO: 119)
 Vk-2: CGAT(A/G)TTGTGATGAC(C/T)CAG (SEQ ID NO: 120)
 Vk-3: CGAAAT(T/A)GTG(T/A)TGAC(G/A)CAGTCT (SEQ ID NO: 121)
 Vk-4: CGACATCGTGATGACCCAGT (SEQ ID NO: 122)
 35
 VI-1: CCAGTCTGTGCTGACTCAGC (SEQ ID NO: 123)
 VI-2: CCAGTCTGCCCTGACTCAGC (SEQ ID NO: 124)
 VI-3: CTCCTATGAGCTGAC(T/A)CAGC (SEQ ID NO: 125)
 CgIII: GAC(C/G)GATGGGCCCTTGGTGGGA (SEQ ID NO: 126)
 CkIII: AAGATGAAGACAGATGGTGC (SEQ ID NO: 127)
 40
 CIIII: GGGAACAGAGTGACCG (SEQ ID NO: 128)

Los cebadores y las condiciones de ciclo de PCR usados en la PCR uno y en la PCR dos se adaptaron de las de Wang y Stollar et al. (Journal of Immunological Methods 2000).

- 45 Se desarrolló un conjunto alternativo de cebadores directos para la región variable de cadena pesada para abarcar las secuencias de región variable de cadena pesada que potencialmente no estuviesen cubiertas de manera adecuada por el conjunto de cebadores anterior. Se generaron los siguientes cebadores alternativos:

PCR Uno

- 50
 VHL1-58: TCACTATGGACTGGATTTGGA (SEQ ID NO: 129)
 VHL2-5: CCATGGACA(C/T)ACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO: 130)
 VHL3-7: GTAGGAGACATGCAAATAGGGCC (SEQ ID NO: 131)
 VHL3-11: AACAAAGCTATGACATATAGATC (SEQ ID NO: 132)
 55
 VHL3-13.1: ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTT (SEQ ID NO: 133)
 VHL3-13.2: AGTTGTTAAATGTTTATCGCAGA (SEQ ID NO: 134)
 VHL3-23: AGGTAATTCATGGAGAAAATAGAA (SEQ ID NO: 135)
 VHL4-39: AGAACATGAAGCA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO: 136)
 VHL4-61: ATGGACTGGACCTGGAGCATC (SEQ ID NO: 137)
 60
 VHL-9: CCTCTGCTGATGAAAACCAGCCC (SEQ ID NO: 138)

PCR Dos

- 65
 VH1-3/18: CAGGT(C/T)CAGCT(T/G)GTGCAGTC (SEQ ID NO: 139)
 VH1-45/58: CA(A/G)ATGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 140)
 VH2-5: CAG(A/G)TCACCTTGA(A/G)GGAGTCTGGT (SEQ ID NO: 141)

VH3-9/23/43: GA(A/G)GTGCAGCTG(T/G)TGGAGTC (SEQ ID NO: 142)
 VH3-16: GAGGTACAACCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 143)
 VH3-47: GAGGATCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 144)
 V4-34: CAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO: 145)
 5 V4-30-2/ 39: CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 146)
 VH7-4-1: CAGGTGCAGCTGGTGCATC (SEQ ID NO: 147)

En resumen, se usaron 2 µl de ADNc generado mediante amplificación de ARNm como molde para la primera ronda de PCR, con las siguientes condiciones de ciclo: 3 ciclos de preamplificación (94°C/45 segundos, 45 °C/45 segundos, 72 °C/105 segundos); 30 ciclos de amplificación (94 °C/45 segundos, 50 °C/45 segundos, 72 °C/105 segundos); 10 minutos de extensión final a 72 °C.

3 µl del producto de la primera ronda de PCR sirvieron como molde para la segunda ronda de PCR anidada. Se usaron las mismas condiciones de ciclo para la primera ronda de PCR, pero se omitieron los 3 ciclos de preamplificación. Ambas etapas PCR se llevaron a cabo mediante el uso de Pfu polimerasa AD clonada (Agilent Technologies). Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 1 % y se aislaron productos de 300-400 nucleótidos de tamaño mediante el uso del kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean (Zymo Research). La secuenciación se llevó a cabo mediante el uso de cebadores directos e inversos usados para la segunda ronda de PCR anidada. Una PCR anidada en dos etapas amplifica los dominios variables de BCR de las cadenas pesada y ligera (véase lo anterior). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con melanoma en estadio avanzado que habían sido vacunados con células tumorales autólogas transducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006). Los anticuerpos se expresaron en forma de anticuerpos IgG1 de longitud completa en un sistema de expresión transitoria en CHO-S.

Se llevó a cabo la validación de la unión del anticuerpo anti-MICA a MICA usando dos ensayos independientes basados en perlas. EL primer ensayo usó un kit de ensayo de perlas basado en disolución diseñado para la detección de anticuerpos anti-MICA reactivos con diversos alelos de MICA (One Lambda, número de catálogo LSMICA001). Se incubaron con perlas diversas concentraciones del anticuerpo para MICA, después se lavaron, y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Después de una segunda etapa de lavado, se analizaron las perlas en una máquina Luminex. Un control negativo consintió en la incubación de perlas con anticuerpo anti-IgG humana conjugado solo con ficoeritrina (sin anticuerpo anti-MICA). Un control positivo consistió en la incubación de perlas con un anticuerpo monoclonal anti-MICA/MICB disponible comercialmente (clon 6D4) conjugado directamente a ficoeritrina (BioLegend, n.º de catálogo 320906). El segundo ensayo se desarrolló internamente usando perlas de poliestireno conjugadas con estreptavidina. Las perlas se recubrieron con proteína MICA monobiotinilada, y se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpo anti-MICA, anticuerpo anti-TTCF (control negativo de isotipo), o anticuerpo anti-MICA/MICB de BioLegend conjugado directamente a ficoeritrina (control positivo). Las perlas incubadas con anticuerpo anti-MICA o anticuerpo anti-TTCF se lavaron y después se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Alexa488. Para determinar la unión de fondo a las perlas, se llevó a cabo la misma incubación usando perlas conjugadas a estreptavidina no recubiertas con proteína MICA por comparación. Se analizó la unión de las perlas a los anticuerpos en un citómetro de flujo FACS Calibur.

Tal como se muestra en las FIG. 24 y 25, los anticuerpos anti-MICA (MICA-Ab12 y MICA-Ab20) se unen con alta afinidad a MICA. MICA-Ab20 corresponde al anticuerpo anti-MICA ID-1 descrito en la tabla 1.

45 **Ejemplo 6: Anticuerpos anti-MICA**

Se desarrollaron anticuerpos anti-MICA adicionales con propiedades biológicas clínicamente relevantes usando los métodos del presente documento. Se identificaron anticuerpos específicos de MICA reactivos con alelos comunes en pacientes que habían recibido una vacuna celular para el cáncer (células cancerosas transducidas con GM-CSF, citadas como GVAX) y un anticuerpo que bloquea al receptor inhibidor CTLA-4 en células T, ipilimumab (YERVOY™ (disponible en Bristol Myers Squibb)). Después, se usaron tetrámeros de MICA para aislar células B de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la mayor reactividad sérica contra MICA. Se determinaron las cadenas ligera y pesada a partir de estas células B mediante PCR de células individuales, tal como se indica en el ejemplo 5. Este esfuerzo dio lugar a la identificación de anticuerpos que reconocen alelos comunes en la población de Estados Unidos.

Ab2 CM24002 (anticuerpo anti-MICA ID-6 descrito en la tabla 1) es un anticuerpo aislado de un paciente con leucemia mieloide aguda (AML) que mostró una respuesta clínica significativa a la terapia combinada de GVAX + ipilimumab y cuyo plasma reaccionó fuertemente con MICA. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (FIG. 30 y 31) y la cadena pesada (FIG. 28 y 29) de Ab2 CM24002, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Se obtuvo un anticuerpo adicional con fuerte unión del mismo paciente y se marcó como Ab4 CM24002 (anticuerpo anti-MICA ID-7, descrito en la tabla 1). Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (FIG. 34 y 35) y la cadena pesada (FIG. 23 y 32) de Ab4 CM24002, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas.

Ab11 CM33322 (anticuerpo anti-MICA ID-8 descrito en la tabla 1) y Ab29 CM33322 (anticuerpo anti-MICA ID-9

descrito en la tabla 1) son anticuerpos aislados de un paciente con melanoma metastásico que ha respondido a largo plazo (> 15 años) a la terapia combinada de GVAX + ipilimumab. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (FIG. 38 y 39) y la cadena pesada (FIG. 36 y 37) de Ab11 CM33322, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (FIG. 42 y 43) y la cadena pesada (FIG. 40 y 41) de Ab29 CM33322, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Debido a la respuesta clínica de larga duración de este paciente, estos anticuerpos son particularmente interesantes.

Después de la identificación, clonación y expresión inicial de los anticuerpos de interés, se determinó la especificidad de estos anticuerpos por diferentes alelos de MICA con un ensayo citométrico en perlas. En resumen, se expresaron, purificaron y capturaron en perlas de estreptavidina los alelos de MICA 002, 008, 009 y MICB solubles con un solo sitio de biotilación de BirA. Después, se incubaron los anticuerpos anti-MICA indicados con las perlas recubiertas con MICA recombinante a diferentes concentraciones durante una hora, después se lavaron, y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con FITC. Después de una segunda etapa de lavado, se completó la cuantificación de la fluorescencia de FITC unido a perlas mediante citometría de flujo. Se seleccionaron los alelos 002, 008 y 009 de MICA así como la proteína relacionada MICB basándose en su prevalencia en la población norteamericana (FIG. 48). Asimismo, se seleccionaron los alelos 002, 008 y 009 de MICA así como la proteína relacionada MICB basándose en su prevalencia generalmente elevada en todo el mundo. De manera importante, Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 se unieron fuertemente a todos los alelos de MICA así como a MICB. Los otros dos anticuerpos se unieron a un subconjunto de alelos: Ab4 CM24002 se unió fuertemente a MICA*009 y a MICB, y Ab11 CM33322 se unió fuertemente a MICA*002, MICA*008, y MICB. (FIG. 48A-F). Se observó especificidad mediante el uso de un anticuerpo humano de control negativo generado con la misma tecnología (específico para el fragmento C-terminal del toxoide tetánico, TTCF) y un anticuerpo de control positivo para MICA (un anticuerpo comercial murino de BioLegend dirigido contra MICA). Estos estudios identificaron a Ab2 CM24002 y a Ab29 CM33322 como potenciales candidatos para aplicación clínica.

Ejemplo 7: Unión de anticuerpo anti-MICA a células tumorales autólogas

Se examinó por citometría de flujo la capacidad del anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002 aislado para unirse a células tumorales autólogas (FIG. 49). Se obtuvo médula ósea del paciente CM24002 y se comprobó la unión a células tumorales mediante Ab2 CM24002. Después, se identificaron las células tumorales de la muestra de médula ósea como células CD33+ CD34+. Después, se tiñeron las células tumorales con 10 µg/ml de anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002, anticuerpo para MICA comercial de control positivo (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF). Tal como se muestra en la FIG. 49, Ab2 CM24002 se unió fuertemente a estas células. Ab2 CM24002 no mostró unión a células no tumorales (células CD16+ y CD3+) y solo unión de fondo a células CD14+, demostrando especificidad antitumoral (datos no mostrados).

Ejemplo 8. Inhibición del receptor NKG2D en células NK por el anticuerpo anti-MICA.

Se examinó la capacidad del anticuerpo anti-MICA aislado, Ab2 CM24002, para prevenir la regulación negativa mediada por MICA soluble de su receptor afín, NKG2D. Se usó suero del paciente CM24002 a una dilución 1:10 y se incubó con células NK humanas durante un periodo de 48 horas. Se añadieron a estos cultivos Ab2 CM24002 (concentración de 10 µg/ml), anticuerpo para MICA comercial de control positivo (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF). Se evaluó la expresión de NKG2D mediante citometría de flujo a las 48 h (FIG. 50). El suero del paciente CM24002 reguló negativamente en gran medida la expresión de NKG2D (deshabilitando de este modo la función de este receptor). Ab2 CM24002 y el anticuerpo para MICA de control positivo restauraron parcialmente la expresión superficial de NKG2D por células NK. Para demostrar especificidad, los presentes inventores repitieron el experimento anterior incubando células con MICA recombinante a 2 ng/ml en lugar de suero de paciente (FIG. 51). Ab2 CM24002 previno completamente la regulación negativa mediada por MICA de la expresión de NKG2D, mientras que el anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) no tuvo efecto (FIG. 51). Estos datos demuestran que los anticuerpos para MICA humano pueden prevenir la inhibición del receptor crítico NKG2D en células NK humanas.

Ejemplo 9: Citotoxicidad mediada por células del anticuerpo anti-MICA

Para determinar si Ab2 CM24002 posibilita la citotoxicidad mediada por células, se incubaron células NK humanas (células efectoras) durante 48 horas con MICA recombinante (2 ng/ml) en presencia de Ab2 CM24002, un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), todos a 10 µg/ml. Después de 48 horas, se lavaron las células y se incubaron con células tumorales K562 a relaciones de efector:diana de 20:1, 10:1, y 5:1 durante 4 horas. Se determinó la lisis específica de células diana por las células NK mediante la liberación de una proteína citosólica (LDH) de las células tumorales K562. En ausencia de anticuerpos para MICA, no se produjo eliminación de células tumorales K562 por parte de células NK. Sin embargo, Ab2 CM24002 potenció en gran medida la lisis mediada por células NK de las células tumorales K562 y fue más eficaz que el anticuerpo para MICA murino de control positivo a todas las relaciones de efector:diana (FIG. 52). Se demostró además que la eliminación de células tumorales K562 estaba de hecho mediada por la ruta de NKG2D (en lugar de receptores Fc). Se repitió el experimento anterior, con la adición de dos grupos experimentales: un

anticuerpo de bloqueo para NKG2D y bloqueo de Fc humano. Además, también se ensayó Ab29 CM33322. Los datos muestran que la adición de Ab2 CM24002 y de Ab29 CM33322 posibilitó la citotoxicidad mediada por células NK. La eliminación de células K562 no se produjo cuando se añadió un anticuerpo bloqueante de NKG2D, mientras que el reactivo bloqueante de Fc tuvo un efecto limitado (FIG. 53). Estos datos demuestran que Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 restauran la función antitumoral de la ruta de NKG2D.

Ejemplo 10: Unión de anticuerpo anti-MICA al dominio alfa 3 de MICA

El receptor NKG2D se une a los dominios alfa 1 y alfa 2 superiores de MICA, y los anticuerpos que se unen al mismo sitio pueden competir con el receptor NKG2D y de este modo bloquear la eliminación de células tumorales por células NK. Los anticuerpos que se unen al dominio alfa 3 son particularmente interesantes debido a que no pueden bloquear la unión al receptor NKG2D. Al mismo tiempo, dichos anticuerpos pueden interferir con la escisión proteolítica de MICA de la superficie de las células tumorales. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para el dominio alfa 3 de MICA usando el ensayo citométrico en perlas anteriormente descrito. Se capturó la proteína recombinante biotinilada sobre perlas de estreptavidina. Después, se incubaron las perlas con los anticuerpos Ab2 CM24002, Ab4 CM24002, Ab11 CM33322, Ab29 CM33322, un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), a 10 µg/ml seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con FITC y cuantificación de la fluorescencia de FITC unido a perlas por citometría de flujo (FIG. 54). Tal como se muestra en la FIG. 54, Ab29 CM33322 se unió al dominio alfa 3 de MICA y por lo tanto es de gran interés para aplicaciones terapéuticas.

Ejemplo 11: Unión de anticuerpo anti-MICA a células tumorales

Se evaluó el potencial de Ab2 CM24002 y de Ab29 CM33322 para su uso para dirigirse a una gran variedad de cánceres. Se ensayó el marcaje de un panel de células de mieloma múltiple (RPMI 8226 y Xg-1), de cáncer de ovario (OVCAR3), de leucemia mieloide aguda (U937), de melanoma (K028), de cáncer de pulmón (1792 y 827) y de cáncer de mama (MCF7) mediante Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322. Las células tumorales se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en PBS con BSA al 1 % y se tiñeron con Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322, así como con controles positivos y negativos (anticuerpo para MICA murino y anticuerpo específico para TTCF, respectivamente) (conjugados directamente) a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora a 4°C. El marcaje se evaluó mediante citometría de flujo (FIG. 55). Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 se unieron a cada uno de los tipos celulares ensayados, siendo mayor el marcaje que el control positivo comercial para la mayoría de las líneas celulares ensayadas.

Ejemplo 11a: Especificidad de alelo de MICA del anticuerpo anti-MICA

Se evaluó la especificidad alélica de Ab29 CM33322 usando un ensayo Luminex disponible comercialmente. El kit de ensayo comercial contiene alelos de MICA recombinantes (MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018, *027, *004, *009, y *015) conjugados directamente a perlas Luminex, cada una con propiedades fluorescentes intrínsecas que posibilitan la evaluación de la unión en una sola muestra. Se incubaron las perlas Luminex recubiertas con los alelos de MICA indicados con Ab29 CM33322, control positivo de BioLegend, y el control negativo (TTCF), a 10 µg/ml durante 1 h, con incubación posterior con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado a FITC. Se determinó la fluorescencia después de incubación durante 60 minutos con los anticuerpos indicados y la posterior incubación con anticuerpo secundario anti-humano conjugado a PE usando un instrumento Luminex 200 (FIG. 56). Ab29 CM33322 fue capaz de unirse a todos los alelos presentes en el ensayo comercial, lo que indica que puede usarse en pacientes independientemente del genotipo de MICA.

Estos datos demuestran la elevada actividad biológica de Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 y su capacidad para restaurar la lisis mediada por células NK de células tumorales. Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer que respondieron a las inmunoterapias produjeron anticuerpos para MICA que restauraron la actividad antitumoral de las células NK. En su conjunto, estos resultados destacan el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-MICA para superar la supresión inmunitaria y promover la destrucción del tumor en pacientes con cáncer.

Ejemplo 12: Obtención de anticuerpos anti-angiopoyetina-2

Se desarrollaron anticuerpos que se unen a angiopoyetina-2 usando los métodos del presente documento. En resumen, se adquirió angiopoyetina-2 biotinilada (UniGene Hs.583870) de R&D Systems. Se descongelaron rápidamente células mononucleares de sangre periférica, se lavaron y se resuspendieron a 5×10^6 en suero salino taponado con fosfato (pH 7,2) complementado con suero fetal de ternero al 2 % y se tiñeron con aproximadamente 0,5 µg/ml de angiopoyetina-2 durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con 4ml de PBS/FCS al 2 %. Después, se añadieron los anticuerpos para identificar células B de memoria con la clase cambiada (CD19+, CD27+ e IgM-) así como SA-PE para marcar células B con angiopoyetina biotinilada en la superficie. Se incluyó un panel de anticuerpos de exclusión que etiquetan a células T, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos y células muertas para reducir la tinción de tetrámero de fondo (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Las células B individuales que se unieron a angiopoyetina-2 se clasificaron en tiras para PCR de 8 tubos usando el BD FACS Aria II. Se amplificó el ARNm del receptor de células B (BCR) usando un kit comercial de Epicentre Biotechnologies (número de catálogo:

MBCL90310) usando cebadores para genes específicos (véase más arriba). Una PCR anidada en dos etapas amplifica los dominios variables de BCR de las cadenas pesada y ligera (véase lo anterior). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de un paciente con carcinoma de pulmón no microcítico maligno que había sido vacunado con células tumorales autólogas transducidas con el vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (Cancer Res. 70: 10150, 2010). Los anticuerpos se expresaron en forma de anticuerpos IgG1 de longitud completa en un sistema de expresión transitoria en CHO-S.

La validación de la unión de los anticuerpos anti-angiopoyetina-2 a angiopoyetina-2 se llevó a cabo usando ensayos ELISA. En resumen, se recubrió angiopoyetina-2 durante una noche a 4 µg/ml en tampón de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 9,6 en placas de 96 pocillos de fondo plano (PerkinElmer) a 4°C. Las placas se bloquearon con tampón de ensayo que contenía seroalbúmina bovina y gamma globulinas bovinas (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante tres horas. Los anticuerpos se diluyeron en tampón de ensayo a 20 µg/ml-0,16 µg/ml y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, Tween al 0,05 %). Se añadieron 100 µl de solución potenciadora (PerkinElmer) a cada pocillo y se midieron los recuentos de fluorescencia usando un lector de placas Victor3 (PerkinElmer) a una longitud de onda de 615 nm. También se comprobó la unión a angiopoyetina-1 y -4 humana y mostró una actividad similar.

Los datos relevantes se muestran en las FIG. 27A-27C, que proporcionan gráficas y un gel relacionado con el aislamiento de anticuerpos específicos para angiopoyetina de un paciente con cáncer de pulmón. (A) Reactividad con angiopoyetina-2 del suero de paciente con cáncer de pulmón (L19) (diluido a 1:1000) determinada mediante ELISA. Los datos de la recogida de suero se muestran en el eje X. La proteína de control, seroalbúmina bovina (BSA), se incluyó como control negativo. (B) Gráfica de FACS que presenta la muestra de PBMC (instante- 10/98) clasificada en células B CD19+, CD27+ IgM con CD 19 en el eje X y angiopoyetina-2 etiquetada fluorescentemente en el eje Y. La ventana lógica indica de manera aproximada dónde se efectuó el corte de clasificación. Después, se clasificaron células B a partir de esta muestra. (C) Productos de la PCR de cadena pesada, ligera y de la región bisagra de 10 células B de memoria reactivas con angiopoyetina-2 aisladas del paciente L19. Productos de la PCR de cadena pesada (parte superior) y ligera (parte inferior) después de dos rondas de PCR anidada de aproximadamente 350 pares de bases.

Ejemplo 13: Unión de anticuerpos anti-angiopoyetina-2 contra miembros de la familia de angiopoyetina humana recombinante

Se recubrieron placas de 96 pocillos con 4 µg/ml de angiopoyetina-1, - 2, y -4 recombinante (R&D Systems) en tampón de bicarbonato de sodio a pH 9,6. Posteriormente, se bloquearon las placas durante 3 horas a temperatura ambiente con tampón de ensayo (Perkin Elmer) que contenía seroalbúmina bovina (BSA) y gamma globulinas bovinas. Los anticuerpos ID 2, 3, 4, y 5 (véase la tabla 1), diluidos a entre 20 µg/ml-0,16 µg/ml, se incubaron en placas durante 1 hora a 4 °C con rotación. Posteriormente, se lavaron las placas antes de incubarlas con anticuerpo anti-IgG humana-europio (Perkin Elmer). Se obtuvieron recuentos de fluorescencia a 615 nm mediante un lector de placas. Se usó un anticuerpo de control negativo (clon 8.18.C5) para determinar la especificidad. Los datos se determinaron por duplicado.

Tal como se muestra en las FIG. 26A-26C, los anticuerpos ID 2, 3, 4, y 5 (véase la tabla 1) se unen con alta especificidad a angiopoyetina-1, -2, y -4. Los anticuerpos no se unen a similar a ang-3, una proteína relacionada estructuralmente (véase la FIG. 26D).

Se desarrolló un anticuerpo anti-angiopoyetina adicional, denominado Ab6 anti-Ang2 (anticuerpo anti-MICA ID-10 descrito en la tabla 1) con propiedades biológicas clínicamente relevantes, usando los métodos del presente documento. Se analizó la unión de Ab6 anti-Ang2 a miembros de la familia de angiopoyetina humana recombinante tal como se ha descrito anteriormente. En resumen, Se recubrieron placas de ELISA con 4 µg/ml de las angiopoyetinas Ang-1, Ang-2, Ang4, y similar a Ang-3, y se comprobó la detección mediante Ab6 anti-Ang2 a 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0,8 µg/ml, y 0,16 µg/ml. Se usó anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con europio, midiéndose los recuentos de europio después de 45 minutos. Tal como se muestra en la FIG. 57, Ab6 anti-Ang2 se une a todas las angiopoyetinas de una manera dependiente de la dosis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

<130> M/55081-EP-DIV1

<150> EP12835118.6

<151> 28-09-2012

ES 2 757 473 T3

<150> PCT/US2012/057839
 <151> 28-09-2012

5 <150> 61/541.921
 <151> 30-09-2011

<160> 238

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

20 <400> 1

```

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctggccctc      60
acctgcgctg tctctggtgg gtccttcaact gatcattact ggagttggat ccgtcaggcc      120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggagaa atcaatcata gtggagtcac caactacaac      180
ccgtccctca agagtgcact caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg      240
aggctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctctgtact actgtgcgaa aactggcctg      300
tattatgatg acgtttgggg gacttttcgt ccacggggcg ggttcgactc ctggggccag      360
ggaaccctgg tcaccgtctc ctca                                             384
    
```

25 <210> 2
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

```

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

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Phe Thr Asp His
20           25           30
    
```

ES 2 757 473 T3

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

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

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

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

Lys Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Val Trp Gly Thr Phe Arg Pro Arg
 100 105 110

Gly Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 3

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

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Ser
 20 25

15 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 4

Gly Gly Ser Phe Thr Asp His Tyr
 1 5

25 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 5

ES 2 757 473 T3

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

Glu

5 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 6

Ile Asn His Ser Gly Val Thr
 1 5

15 <210> 7
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 7

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

Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 35

25 <210> 8
 <211> 22
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35 <400> 8

Ala Lys Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Val Trp Gly Thr Phe Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Gly Phe Asp Ser

40 20
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>

ES 2 757 473 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 9

5 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 339

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

15 <400> 10

gacatcgtga tgaccagtc tccggactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtatttta tatagctccg acaataagaa ttacttagct 120
tgggtaccagc acaagccagg acagcctcct aagctcctct tttactgggc atctatccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc ggcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtcct 300
ccttgagtt ttggccaggg gaccaagctg gagatccaa 339

<210> 11

20 <211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Phe Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val

30

ES 2 757 473 T3

50

55

60

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

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

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

Gln

5 <210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
20 25

15 <210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 13

25 Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

30 <210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 14

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Phe
1 5 10 15

Tyr

40 <210> 15
<211> 3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 15

Trp Ala Ser
 1

10 <210> 16
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

20 Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 17
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 17

Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Pro Cys Ser
 1 5

35 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
 1 5 10

45 <210> 19
 <211> 363
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 19

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt atttattgga gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca tatccaagaa cagcgtgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcgat      300
tactatgggtt cgggggctca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc      360
tca                                                                              363

```

5

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 20

15

```

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

```

20

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 757 473 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 22

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

20

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 23

30

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

Gly

<210> 24

35 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 24

Ile Tyr Trp Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

45

<210> 25

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 25

ES 2 757 473 T3

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

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

5 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 26

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 27

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

25 <210> 28
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 35 <400> 28

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagcca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt atcagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tactactgca tgcaaggtac acaatttcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

40 <210> 29
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 473 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 29

5

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 30

<211> 26

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15

<400> 30

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

20

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 31

30

Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 17

ES 2 757 473 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 32

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

10 <210> 33
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 33

20 Gln Ile Ser
 1

<210> 34
 <211> 36
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

30 <400> 34

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

35 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 35

Met Gln Gly Thr Gln Phe Pro Arg Thr
 1 5

45 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 473 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 36

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 37

10 <211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 37

gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcaggggt cacctttagt aataactgga tgcactgggt ccgccaggct 120

20 ccaggggaagg ggctggagtg gatctcagag attagaagtg atgggaattt cacaaggtac 180

gcggactcca tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag cacactgtat 240

ttgcaaatga acagtctgag agtcgaggac acgggtctgt attactgtgc aagagactac 300

ccctatagca ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 38

25 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 38

ES 2 757 473 T3

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

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

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

Ser Glu Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 39

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

20 <210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Trp
 1 5

30 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 757 473 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5

<400> 41

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Glu

10

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 42

Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr
 1 5

20

<210> 43
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

30

<400> 43

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

Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp
 20 25 30

Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
 35

35

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 44

45

Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>

ES 2 757 473 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 48

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 48

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser
 20 25

15 <210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 49

25 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 50

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 50

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

5

<210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 51

15

Glu Ile Ser
 1

<210> 52
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25

<400> 52

Lys Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

30

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 53

Met Gln Gly Lys Gln Leu Arg Thr
 1 5

40

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50

<400> 54

ES 2 757 473 T3

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

5 <210> 55
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 55

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggggggctc cgtgagactg 60
 tcttgtgogg cctcaggctt cattcttagc aactttgccca tgagttgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggactg ggtctcaggt aattttggtg gtcgtgaaaa tacatattac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca gttccaagag cacactgtat 240
 ctgcaaatga acaatttgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgaggcgat 300
 taccatgggtt cggggggctca ctttgactac tggggccagg gaatactggt caccgtctcc 360
 tca 363

15 <210> 56
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 56

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

ES 2 757 473 T3

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 57

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

15 <210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 58

25 Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe Ala
 1 5

30 <210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 59

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 60

15

Asn Phe Gly Gly Arg Glu Asn Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25

<400> 61

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

Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

30

<210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 62

Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
 1 5 10

40

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50

<400> 63

ES 2 757 473 T3

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

5 <210> 64
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 64

gatattgtga tgaccagag tccactctcc tcacctgtca tccttgaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctccta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcaccaga ggccaggcca gcctcctaga ctcctaattt atcagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt gggacagga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgccgggatt tattactgca tgcaaggtag agaatttcct 300
 cggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaa 336

15 <210> 65
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 65

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

30 <210> 66

ES 2 757 473 T3

<211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 66

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

10 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

<210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 67

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

25 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 68

Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

35 <210> 69
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 69

45 Gln Ile Ser
 1

50 <210> 70
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 70

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys
35

5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15

<400> 71

Met Gln Gly Thr Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

20

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 72

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

30

<210> 73
<211> 384
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 73

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgatacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcaa cctctggatt cacctttaga acttcttcca tgagttgggt ccgtcgggct 120
ccaggaaggg ggctggaatg ggtctcagct attggtgctg aaagtcatga cacgcactac 180
acagactccg cggaggggccc gttcaccatc tccaaagact attcaaagaa cacagtatat 240
ctgcagatga acggcctgag agtcgacgac acggccatat attattgtgc ccatcactat 300
tactatggct cgcggcagaa acccaaagat tggggagatg cttttgatat gtggggccag 360
gggacaatgg tctccgtctc ttca 384

40

ES 2 757 473 T3

<210> 74
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 74

10

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr His Tyr Thr Asp Ser Ala
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
 100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
 115 120 125

15

<210> 75
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser
 20 25

25

<210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>

ES 2 757 473 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 76

5 Gly Phe Thr Phe Arg Thr Ser Ser
1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 77

Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 78

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 78

Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr
1 5

30 <210> 79

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 79

40 <210> 80

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <400> 79

His Tyr Thr Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Tyr
1 5 10 15

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

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 80

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <400> 79

ES 2 757 473 T3

<400> 80

Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Asp Met
 20

5 <210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 81

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 82
 <211> 321
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

25 <400> 82

gacatccaga tgaccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctgggtaa cctgggatca gcagagagca 120
 ggggaaggccc ctaacctcct gatctatggg gcatccactt tggaagatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagcg gcagtggatc cgggacagat ttcactctca ctatcgacag cctgcagcct 240
 gacgattttg caacttacta ttgtcaacag tctcacagtt tcccctacac ttttggccag 300
 gggaccagc tggggatctc a 321

30 <210> 83
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 83

ES 2 757 473 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
 100 105

<210> 84
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10

<400> 84

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

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

<210> 85
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20

<400> 85

Gln Asp Ile Ser Thr Trp
 1 5

25

<210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 86

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

5

<210> 87
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 87

15

Gly Ala Ser
1

<210> 88
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25

<400> 88

Thr Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

30

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 89

Gln Gln Ser His Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

40

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50

<400> 90

ES 2 757 473 T3

Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
 1 5 10

5 <210> 91
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 91
 taatacgact cactataggt tcggggaagt agtccttgac cagg 44

15 <210> 92
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 92
 taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcaggc acac 44

25 <210> 93
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 93
 taatacgact cactataggg gtcaggctca grtagctgct ggccgc 46

35 <210> 94
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

45 <400> 94
 aatagactc actataggtt cggggaagta gtccttgacc agg 43

50 <210> 95
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 95
 taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcaggc acac 44

60 <210> 96
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 96
 taatacgact cactataggc gtcaggctca grtagctgct ggccgc 46

5 <210> 97
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 97
 tcacatgga ctgsacctgg a 21

15 <210> 98
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 98
 ccatggacac actttgctcc ac 22

25 <210> 99
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 99
 tcacatgga gtttggctg age 23

35 <210> 100
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 100
 agaacatgaa acayctggtg ttett 25

45 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 101
 atggggtaaa ccgcatcct 20

55 <210> 102
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 102
 acaatgtctg tctccttct cat 23

5 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 103
 gctcagctcc tggggctct g 21

15 <210> 104
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 104
 ctggggctgc taatgctctg g 21

25 <210> 105
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 105
 ttctctctgc tactctggct c 21

35 <210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 106
 cagaccagg tcttcattc t 21

45 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 107
 cctctctcc tcacctct 20

55 <210> 108
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 108
 ctctcactc agggcaca 18

5 <210> 109
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 109
 atggcctgga ycsctctcc 19

15 <210> 110
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 110
 gccaggggga agacsgatg 19

25 <210> 111
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 111
 ttcaactgc tcatcagatg gcgg 24

35 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 112
 agctcctcag aggaggygg 20

45 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 113
 caggtsccagc tggtrcagtc 20

55 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 114
 cagrtcacct tgaaggagtc 20

5 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 115
 saggtgcagc tggaggagtc 20

15 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 116
 caggtgcagc tgcaggagtc 20

25 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 117
 gargtgcagc tggtagcagtc 20

35 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 118
 caggtacagc tgcagcagtc 20

45 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 119
 cgmcatccrg wtagccagtc 20

55 <210> 120
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 120
 cgatrttg atgacycag 19

5 <210> 121
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 121
 cgaaatwgtg wtgacrcagt ct 22

15 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 122
 cgacatcgtg atgaccagt 20

25 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 123
 ccagtctgtg ctgactcagc 20

35 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 124
 ccagtctgcc ctgactcagc 20

45 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 125
 ctctatgag ctgacwcagc 20

55 <210> 126
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 126
 gacsgatggg cccttggtg a 21

5 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 127
 aagatgaaga cagatggtgc 20

15 <210> 128
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 128
 gggaacagag tgaccg 16

25 <210> 129
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 129
 tcactatga ctggatttg a 21

35 <210> 130
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 130
 ccatggacay actttggtcc ac 22

45 <210> 131
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 131
 gtaggagaca tgcaaatagg gcc 23

55 <210> 132
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 132
 aacaaagcta tgacatatag ate 23

5 <210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 133
 atggagtgg ggctgagctg gggt 24

15 <210> 134
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 134
 agttgttaaa tgttatcgc aga 23

25 <210> 135
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 135
 aggtaattca tggagaaata gaa 23

35 <210> 136
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 136
 agaacatgaa gcayctggtg ttctt 25

45 <210> 137
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 137
 atggactgga cctggagcat c 21

55 <210> 138
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 138
 cctctgctga tgaaaaccag ccc 23

5 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 139
 caggtycagc tkgtcagtc 20

15 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 140
 caratgcagc tggtcagtc 20

25 <210> 141
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 141
 cagrtcacct tgarggagtc tggc 24

40 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

45 <400> 142
 gargtcagc tkgtgagtc 20

 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 143
 gaggtacaac tggtgagtc 20

55 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 144
gaggatcagc tggaggagtc 20

5 <210> 145
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 145
caggtgcagc tacagcagtg 20

15 <210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 146
cagctgcagc tgcaggagtc 20

25 <210> 147
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 147
caggtgcagc tgggtcaatc 20

35 <210> 148
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

45 <400> 148

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtggagc cttcggggac cctgtccctc 60

acctgcactg tgtctggtgg ctccatcagc aggagtaact ggtggagttg ggtccgccag 120

ccccagggg aggggctgga atggattgga gaaatccatc acattgggag gtccagctac 180

aatccgtccc tcaagagtcg agtcaccatg tctgtagaca agtcccagaa ccagttctcc 240

ctgaggctga cctctgtgac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gaaaaatggc 300

tactacgcta tggacgtctg gggccaaggg accacgggtca ccgtctcctc g 351

50 <210> 149
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 149

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

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

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

Ile Gly Glu Ile His His Ile Gly Arg Ser Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 150
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

15

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcgacttcc tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctac gctacatcct tcagggccac tggcatctca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcaa cagactggaa 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cactatcgta gttcacctcc gtggtacact 300

tttggcccagg ggaccaagct ggacatgaga cgtacgggtg ctgcaccatc tgtc 354

20

<210> 151
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 151

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Asp
20 25 30

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

Ile Tyr Ala Thr Ser Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Pro Trp Tyr Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Leu Asp Met Arg Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val
115

5

<210> 152

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 152

15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 153

<211> 9

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25

<400> 153

Gly Gly Ser Ile Ser Arg Ser Asn Trp
1 5

ES 2 757 473 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5

<400> 158

Cys Ala Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp
1 5 10

10

<210> 159

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 159

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

20

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 160

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

30

<400> 160

Gln Ser Val Ser Ser Asp Phe
1 5

35

<210> 161

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 161

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

45

Tyr

<210> 162

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 162

ES 2 757 473 T3

Ala Thr Ser
1

5 <210> 163
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 163

Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

15 <210> 164
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 164

25 Cys Gln His Tyr Arg Ser Ser Pro Pro Trp Tyr Thr Phe
1 5 10

30 <210> 165
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 165

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

Val

40 <210> 166
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 166

ES 2 757 473 T3

Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Lys
 1 5 10 15

Ser Lys Asn His Phe Ser Leu Thr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
 35

5 <210> 167
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 167

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggggac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctctggtgc ctccattacc aatggtgcct ggtggagttg ggtccgccag 120
 cccccagggga aggggctgga gtggattgga gaaatctatc ttaatgggaa caccaactcc 180
 aaccogtccc tgaagagtcg agtcatcata tcagtggaca agtccaagaa ccacttctcg 240
 ctgaccctga actctgtgac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gaagaacgct 300
 gcctacaacc ttgagttctg gggccagggga gccctggtca ccgtctcctc a 351

15 <210> 168
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 168

ES 2 757 473 T3

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

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

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

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

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

Leu Thr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 169
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 169

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gactgtagc agcccctacg tagcctggta ccagcagaaa 120
 cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca ccagggccac cggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata gatcacta ttacactttt 300
 ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

15 <210> 170
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 170

ES 2 757 473 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 171
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 171

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser
 20 25

15 <210> 172
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 172

25 Gly Ala Ser Ile Thr Asn Gly Ala Trp
 1 5

30 <210> 173
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 757 473 T3

<400> 173

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

Glu

5

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 174

15

Ile Tyr Leu Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 175
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25

<400> 175

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
1 5 10

30

<210> 176
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 176

Cys Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp
1 5 10

40

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 177

50

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

55

<210> 178
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 757 473 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 178

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 179

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 179

Gln Thr Val Ser Ser Pro Tyr
1 5

20 <210> 180

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 180

30 <210> 180

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

35 <210> 181

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 181

Gly Ala Ser
1

45 <210> 182

<211> 35

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

55 <400> 182

ES 2 757 473 T3

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr
 35

5 <210> 183
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 183

Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Tyr Tyr Tyr Thr Phe
 1 5 10

15 <210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 184

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5

25 <210> 185
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
 35 <400> 185

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagaa cctgtcgctc 60
 acctgcactg tctctgatgc ctccatgagt gattatcact ggagctggat ccggcaggcc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattgggctg atgtacagca ctgggagtc ctactacaaa 180
 ccctccctca aaggtcgggt caccatgtca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctggcct ctgtgaccgc cgcagacacg gccatctatt attgtgagag cggacaacat 300
 attggtggct gggcccccc tgacttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

40 <210> 186
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 473 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 186

5

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

10

<210> 187

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 187

20

gatattgtga	tgaccagac	tccaactctcc	tcacctgtca	cccttggaca	gccggcctcc	60
atctcctgca	ggtctagtga	aggcctcgta	tatagtgatg	gagacaccta	cttgagttgg	120
tttcaccaga	ggccaggcca	gcctccaaga	ctcctgattt	ataaaatttc	taaccggttc	180
tctgggggtcc	ccgacagatt	cagtggcagt	ggggcaggca	cagatttcac	actgaaaatc	240
agcaggggtgg	aggctgagga	tgctgggggtt	tattactgca	tgcaagctac	acattttccg	300
tggacgttcg	gccaggggac	caaagtggaa	gtcaaactgt			339

<210> 188

<211> 113

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 757 473 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 188

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

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

Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

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

5 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 100 105 110

Arg

10 <210> 189
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 189

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

20 Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

25 <210> 190
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 190

ES 2 757 473 T3

Asp Ala Ser Met Ser Asp Tyr His
1 5

5 <210> 191
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 191

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

Arg

15 <210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 192

Met Tyr Ser Thr Gly Ser Pro
1 5

25 <210> 193
<211> 37
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
35 <400> 193

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

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Tyr Tyr
35

40 <210> 194
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 194

ES 2 757 473 T3

Cys Ala Ser Gly Gln His Ile Gly Gly Trp Val Pro Pro Asp Phe Trp
 1 5 10 15

5 <210> 195
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 195

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 196
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 196

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

25 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

30 <210> 197
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 197

Glu Gly Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asp Thr Tyr
 1 5 10

40 <210> 198
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 198

Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15

50 Tyr

<210> 199
 <211> 3
 <212> PRT

ES 2 757 473 T3

<400> 203

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tcatatggct tgacctgat acgccaggct      120
ccggggaagg gcctggagtg ggtctcaagt atcagtggca gtggcaataa cacatactac      180
gcagactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca aagtcaagaa gacctatat      240
ctacaaatgg acagcctgac agtcggagac acggccgtct attactgctt aggagtccgt      300
5  cagggccacg gaattccggt catcgtctcc tca                                  333

```

<210> 204

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

15 <400> 204

```

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Val Gly Gln Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
                100                               105                               110

```

<210> 205

20 <211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 205

ES 2 757 473 T3

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gaggctcgta caccgtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 tttctgcaga ggccaggcca ggctccaaga ctctaattt atcggatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cggatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcggcggt tactactgca tgcaagctac acaaatcccc 300
 aacacttttg gccaggggac caagctggag atcaag 336

5 <210> 206
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 206

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

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

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

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

15 Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 207
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 207

ES 2 757 473 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

5 <210> 208
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 208

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

15 <210> 209
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 209

Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15

25 Ser
 <210> 210
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35 <400> 210

Ile Ser Gly Ser Gly Asn Asn Thr
 1 5

40 <210> 211
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 211

ES 2 757 473 T3

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

Val Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Gly Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr
 35

5 <210> 212
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 212

Cys Leu Gly Val Gly Gln
 1 5

15 <210> 213
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 213

Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
 1 5 10

30 <210> 214
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 214

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

40 <210> 215
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 215

50 Gln Ser Leu Val His Arg Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

ES 2 757 473 T3

<210> 216
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 10 <400> 216

 Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15

 Tyr

 15 <210> 217
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 217

 Arg Ile Ser
 1

 25

 30 <210> 218
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

 35 <400> 218

 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
 1 5 10 15

 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

 Val Tyr Tyr
 35

 40 <210> 219
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

 45 <400> 219

 Cys Met Gln Ala Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe
 1 5 10

 50 <210> 220

ES 2 757 473 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 220

10 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5

<210> 221
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
 20 <400> 221

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttaatccagc cggggggggtc cctaagactc 60
 tcctgtgcag cctcgggctt cctcatcagt agttatttca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggccggagtg ggtctcagtt atttatagcg atggtagtac atattacgta 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc acagacaatt ccaagaacac actatatctt 240
 cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gcccgatatt actgtgcgac acggcatttg 300
 aattatgacg gtgaccactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc 360
 aag 363

25 <210> 222
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 222

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

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

35

ES 2 757 473 T3

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

Ser Val Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Thr Arg His Leu Asn Tyr Asp Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120

5 <210> 223
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 223

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgacg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taagcgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggta gtgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttggaatt tattactgca tgcaaggtag acattggccg 300
 acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgaactg tggctgca 348

15 <210> 224
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 224

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

ES 2 757 473 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

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

Thr Val Ala Ala
 115

5 <210> 225
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 225

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

15 <210> 226
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 226

25 Gly Phe Leu Ile Ser Ser Tyr Phe
 1 5

30 <210> 227
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 757 473 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 227

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

5 Val

<210> 228

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 228

Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 229

20 <211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 229

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

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Arg Tyr Tyr
35

30

<210> 230

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 230

40

Cys Ala Thr Arg His Leu Asn Tyr Asp Gly Asp His Trp
1 5 10

<210> 231

<211> 26

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50

ES 2 757 473 T3

<400> 231

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

5 <210> 232
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 232

Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

15 <210> 233
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 25 <400> 233

Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

30 <210> 234
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 234

Lys Val Ser

40 1

45 <210> 235
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 50 <400> 235

ES 2 757 473 T3

Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Ile Tyr Tyr
 35

5 <210> 236
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 236

Cys Met Gln Gly Thr His Trp Pro Thr Phe
 1 5 10

15 <210> 237
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 237

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 1 5 10

25 <210> 238
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35 <400> 238

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se une inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con el polipéptido del CMH de clase I (MICA), en donde el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) y,
- (a) la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 expuesta en la SEQ ID NO: 176 de la VH del anticuerpo ID 7; o
- (b) la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 expuesta en la SEQ ID NO: 194 de la VH del anticuerpo ID 8.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, comprende,
- (a) la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 expuesta en la SEQ ID NO: 176 de la VH del anticuerpo ID 7 y la CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 183 de la VL del anticuerpo ID 7;
- (b) la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 expuesta en la SEQ ID NO: 194 de la VH del anticuerpo ID 8 y la CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 201 de la VL del anticuerpo ID 8.
3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, comprende
- (a) una cadena VL con al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 170, en donde la VL comprende no más de una sustitución de aminoácidos en las CDR en relación a la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 179, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 181 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 183; o
- (b) una cadena VL con al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 188, en donde la VL comprende no más de una sustitución de aminoácidos en las CDR en relación a la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 197, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 199 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID NO: 201.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, comprende,
- (a) una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 172, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 174, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 176, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 179, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 181 y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 183; o
- (b) una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 190, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 192, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 194, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 197, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 199 y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 201.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, comprende
- (a) una cadena VH que comprende la SEQ ID NO: 168 y una cadena VL que comprende la SEQ ID NO: 170; o
- (b) una cadena VH que comprende la SEQ ID NO: 186 y una cadena VL que comprende la SEQ ID NO: 188.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además comprende un agente terapéutico contra el cáncer.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, formulada en forma de una composición farmacéutica.

CAGGTGCAGTACAGCAGTGGGGCCAGGACTGTTGAAGCCCTTCGGAGACCCCTGGCCCTCACCTGCGCTGTCCTCT
 GGTGGTCCCTTCACTGATCATTTACTGGAGTTGGATCCGTTCAGGCCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA
ATCAATCATAGTGGAGTCAACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCAGTAGACACCGTCCCAAG
 AGCCAGTTCCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGGACACGGCTCTGTACTACTGTGCGAAACCTGGCCCTG
 TATTATGATGACGTTTGGGGGACTTTTCGTCCACGGGGCGGTTCCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC
GTCCTCCFCA (SEQ ID NO:1)

FIG. 1

Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	A	L	T	C	A	V	S
G	G	S	F	T	D	H	Y	W	S	W	I	R	Q	A	P	G	L	G	L	E	W	I	G	E
I	N	H	S	G	V	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K
S	Q	F	S	L	R	L	T	S	V	T	A	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	T	G	L
Y	Y	D	D	V	W	G	T	F	R	P	R	G	G	F	D	S	G	Q	G	T	L	L	V	T
V	S	S																						

(SEQ ID NO:2)

FIG. 2

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGGAGAGGGCCACCATCAACTGCCAAGTCC
 AGCCAGAGTATTTATATAGCTCCGACAATAAGATTACTTAGCTTGGTACCAGCACAGCCAGCACAGCCCTCCT
 AAGCTCCCTCTTTACTGGCATCTATCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGGGGGTCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTCAGCAATATTATAGTCTCT
 CCTTGCAGTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCCAA (SEQ ID NO: 10)

FIG. 3

D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S
S	Q	L	S	I	L	Y	S	S	D	N	K	Y	L	A	W	Y	Q	H	K	P	G	Q	P	F
K	L	L	F	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	G	G	S	G	T
D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	S	Q	Q	Y	Y	S	P
P	C	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	Q												

FIG. 4

(SEQ ID NO: 11)

```

+ 1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGAGACTC
61 TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGT AGTTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCACAGT ATTTATTGGA GTGGTGGTAG CACATACTAC
181 GCAGACTCCG TGAAGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA TATCCAAGAA CACGCTGTAT
241 CTGCAAAATGA ACAGTCTGAG AGCCGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGGCCGAT
301 TACTATGGTT CGGGGGCTCA CTTGACTAC TGGGGCCAGG GAACCCCTGGT CACCCGTCCTCC
361 TCA (SEQ ID NO: 19)

```

FIG. 5

```

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
21 SCAASGTFPS SYAMSWVRQA CDR1
41 PGKGLEWVSG IYWSGGSTYY CDR2
61 ADSVKGRFTI SRDISKNTLY
81 LQMNSLRADD TAVYYCARGD CDR3
101 YVSGSAHFDY WQGGLVTVS
121 S (SEQ ID NO: 20)

```

FIG. 6

1 GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
 61 ATCTCCTGCA GGCTAGCCA AAGCCTCGTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
 121 CTTCAGCAGA GCCCAGGCCA GCCTCCAAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTT TAACCCGGTTC
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCCGGGTT TACTACTGCA TGCAAGGTAC ACAATTTTCCCT
 301 CGGACGTTTCGCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA
 (SEQ ID NO: 28)

FIG. 7

1 DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS
 21 ISCRSS**QSIY** HSDGNTYLSW **CDR1**
 41 LQORPGQPPR LLIY**QISNRF** **CDR2**
 61 SGVFDRESGS GAGTDFILKI
 81 SRVEAEDVGV Y**YCMQGTQFP** **CDR3**
 101 **RTEFGQTKVE** IK
 (SEQ ID NO: 29)

FIG. 8

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC CGGGGAGGC TTAGTTCAGC CTGGGGGATC CCTGAGACTC
 61 TCCTGTGCAG CCTCAGGGTT CACCTTTAGT AATAACTGGA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT
 121 CCAGGGAAGG GCTGGAGTG GATCTCAGAG ATTAGAAGTG ATGGGAATTT CACAAGGTAC
 181 GCGGACTCCA TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAG CACACTGTAT
 241 TTGCAAAATGA ACAGTCTGAG AGTCGAGGAC ACGGGTCTGT ATTACTGTGC AAGAGACTAC
 301 CCCTATAGCA TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO: 37)

FIG. 9

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	
21	SCAAS GF FS	NNMHWRQA	CDR1
41	PGKLEWISE	IRSDGNF RY	CDR2
61	ADSMKGRFTI	SRDNAKSTLY	
81	LQMSLRVED	TGLY CARDY	CDR3
101	PYSIDY WGQG	TLVTVSS	(SEQ ID NO: 38)

FIG. 10

1 GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
 61 ATCTCCTGCA CATCTAGTCA AAGCCTCGTA CACAGTAATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
 121 CTTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCCCCAAGA CTCCTAATTT ATGAGATTTC TAAGCGGGTC
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGCAGGGA CAGATTTAC ACTGAAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCGGGGTT TATTA CTGCA TGCAAGGTAA ACAACTTCGG
 301 ACTTTTGGCC AGGGACCAA GCTGGAGATC AAA (SEQ ID NO: 46)

FIG. 11

1 DIVMTQPLS SPVTLGQPAS
 21 ISCTSS**QSLV** HSN**NTY**LSW **CDR1**
 41 LQORPGOPPR LLL**YEISKRV** **CDR2**
 61 SGVFDRESGS GAGTDFTLKI
 81 SRVEAEDVGV **YYCMQ**GKQLR**** **CDR3**
 101 **TFGQGT**KLEI K (SEQ ID NO: 47)

FIG. 12

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGCTC CGTGAGACTG
 61 TCTTGTGCGG CCTCAGGCTT CATTCTTAGC AACTTTGCCA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGACTG GGCTCAGGT AATTTTGGT GTCGTGAAA TACATATTAC
 181 GCAGACTCCG TGAAGGCCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA GTTCCAAGAG CACACTGTAT
 241 CTGCAAAATGA ACAATTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GCGAGGCGAT
 301 TACCATGGTT CGGGGCTCA CTTTACTAC TGGGGCCAGG GAATACTGGT CACCGTCTCC
 361 TCA (SEQ ID NO: 55)

FIG. 13

1 EVQLVESGGG LVQPGGSRVRL
 21 SCAAS**GFILS** NFAMSWVRQA **CDR1**
 41 PGKGLDWVSG **NFGRENTYY** **CDR2**
 61 ADSVKGRFTI SRDSSKSTLY
 81 LQMNRLRAED TAVY**CARGD** **CDR3**
 101 **YHSGAHFDY** WGQGLLVTVS
 121 S (SEQ ID NO: 56)

FIG. 14

1 GATATTGTGA TGACCCAGAG TCCACTCTCC TCACCTGTCA TCCTTGACA GCCGGCCTCC
 61 ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA AAGCCTCCTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
 121 CTTACCCAGA GCCCAGGCCA GCCTCCTAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTT TAACCCGGTTC
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGACAGGGA CAGATTTTCAC ACTGAAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGCCGGGATT TATTACTGCA TGCAAGGTAC AGAATTTTCCT
 301 CGGACGTTCC GCCAAGGAC CAAGGTGGAA ATCAAAA (SEQ ID NO: 64)

FIG. 15

1	DIVMTQSP	LS	SPVILGQPAS	
21	ISCRSS	QSLL	HSDGNTY LSW	CDR1
41	LHQRFQ	QPER	LLIYQI	SNRF CDR2
61	SGVPDR	PSGS	GTGDF	TLKI
81	SRVEAE	DAGI	YYCMQ	GTFFP CDR3
101	RTFGQ	GTKVE	IK	(SEQ ID NO: 65)

FIG. 16

```

1   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGATACAGC CTGGGGGGGTC CCTGAGACTC
61  TCCTGTGCAA CCTCTGGATT CACCTTAGA ACTTCTTCCA TGAGTTGGGT CCGTCGGGCT
121 CCAGGGAAGG GGCTGGAATG GGTCACAGT ATTGGTGCTG AAAGTCATGA CACGCCACTAC
181 ACAGACTCCG CGGAGGGCCG GTTCACCATC TCCAAAGACT ATTCAAAGAA CACAGTATAT
241 CTGCAGATGA ACGGCCTGAG AGTCGACGAC ACGGCCATAT ATTATTGTGC CCATCACTAT
301 TACTATGGCT CGCGGCAGAA ACCCAAAGAT TGGGGAGATG CTTTGTGATAT GTGGGGCCCAG
361 GGGACAAATG TCTCCGTC TC

```

(SEQ ID NO: 73)

FIG. 17

```

1   EVQLVESGGG LIQPGGSLRL
21  SCATSGFTFR TSSMSWVRRR CDR1
41  PGKGLEWVSA IGAESHDTHY CDR2
61  TDSAEGRFTI SKDYSKNTVY
81  LQMNGLRVDD TAIYCAHHY CDR3
101 YGSRQKPKD WGDAFDMWGQ
121 GTMVSVSS (SEQ ID NO: 74)

```

FIG. 18

1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCT GTGTCCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC
 61 ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGATATTAGC ACCTGGTTAA CCTGGTATCA GCAGAGAGCA
 121 GGAAGGCC CTAACCTCCT GATCTATGGT GCATCCACTT TGAAGATGG GGTCCCATCC
 181 AGGTTCAGCG GCAGTGGATC CGGGACAGAT TTCACTCTCA CTATCGACAG CCTGCAGCCT
 241 GACGATTTG CAACTTACTA TTGTCAACAG TCTCACAGTT TCCCCTACAC TTTTGGCCAG
 301 GGGACCCAGC TGGGGATCTC A
 (SEQ ID NO: 82)

FIG. 19

1 DIQMTQSPSS VSASVGDRTV
 21 ITCRAS**QDIS** TWLTYQORA **CDR1**
 41 GKAPNLLI**YG** ASTLEDGVPS **CDR2**
 61 RFGSGSGTD FFLTIDSLQP
 81 DDEATYYC**QQ** SHSFF**YTFGQ** **CDR3**
 101 GTQLGIS
 (SEQ ID NO: 83)

FIG. 20

Tetramerización de antígeno

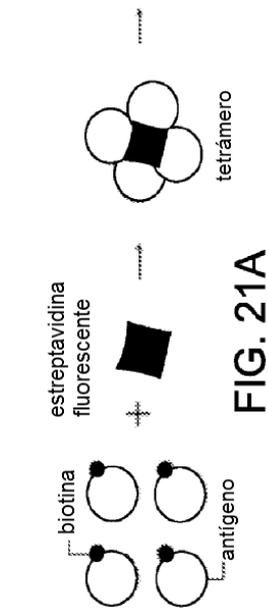


FIG. 21A

Marcado de células B y clasificación de células individuales

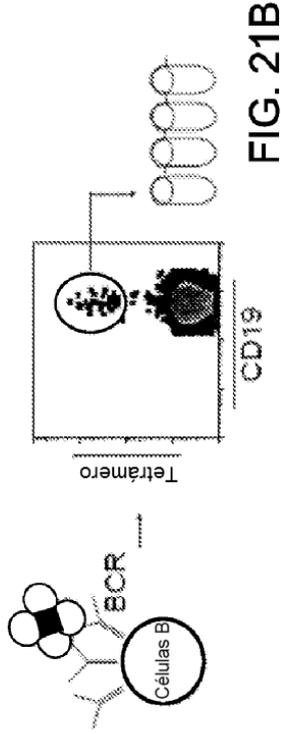


FIG. 21B

Tetramerización de antígeno

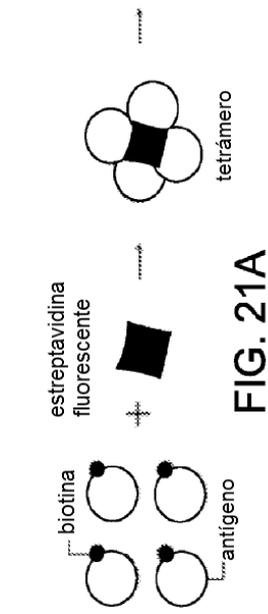


FIG. 21A

Marcado de células B y clasificación de células individuales

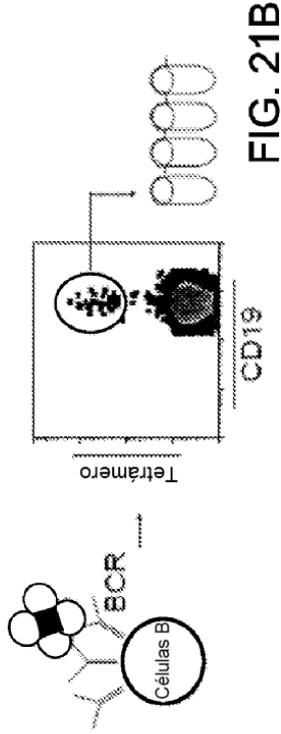


FIG. 21B

Amplificación de ARNm mediada por T7

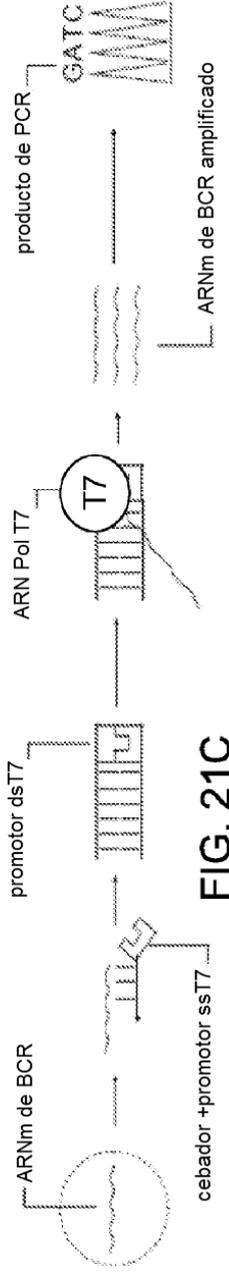


FIG. 21D

Amplificación de ARNm mediada por T7

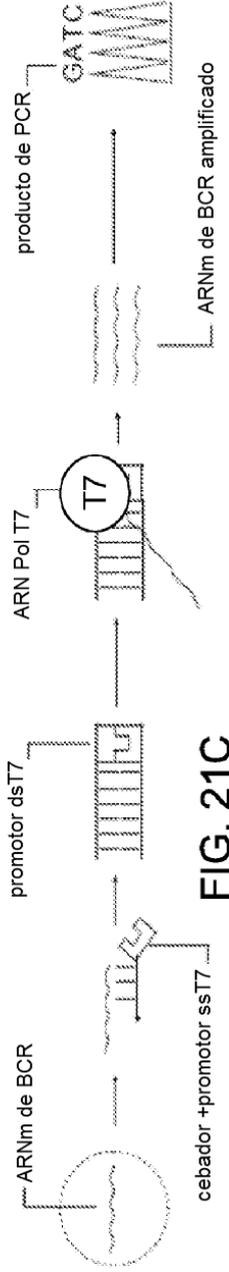


FIG. 21C

Expresión de anticuerpo

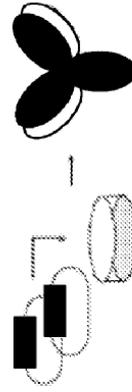


FIG. 21E

Ensayo de actividad

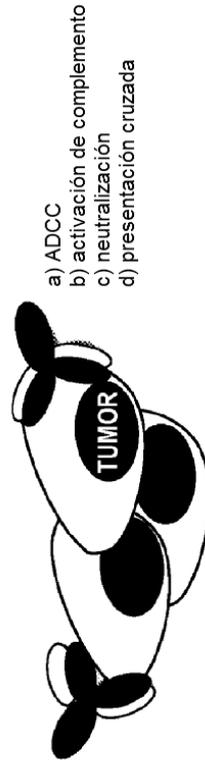


FIG. 21F

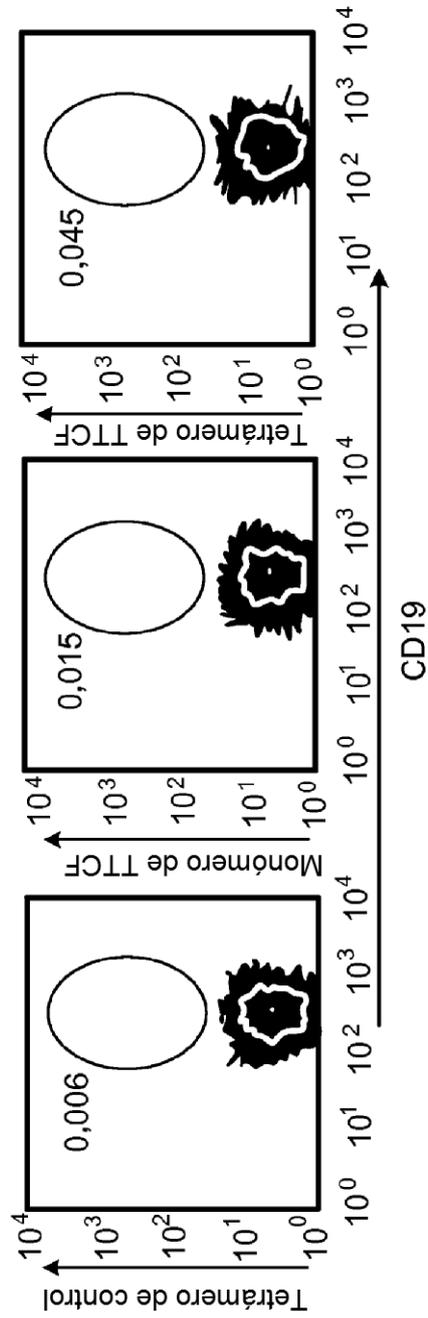


FIG. 22A

Donante	Tet de control/ 10 ⁵ células B	Monómero de TTCF/ 10 ⁴ células B	Tet de TTCF/N.º 10 ⁴ células B	N.º de Tet/N.º de mono Múltiplo de cambio
Donante 1	3,98	2,53	18,41	7,3
Donante 2	15,03	38,64	117,18	3,1
Donante 3	4,14	48,92	77,55	1,6

FIG. 22B

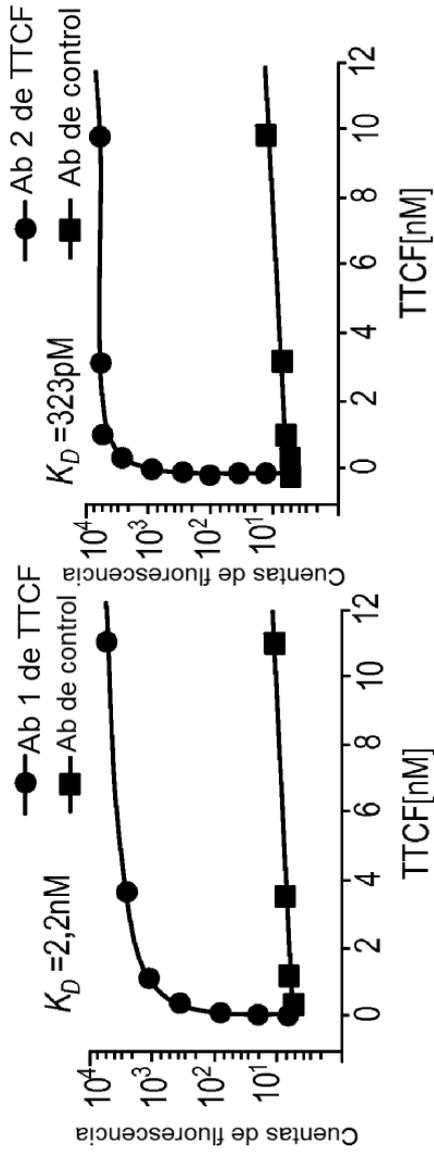


FIG. 23A

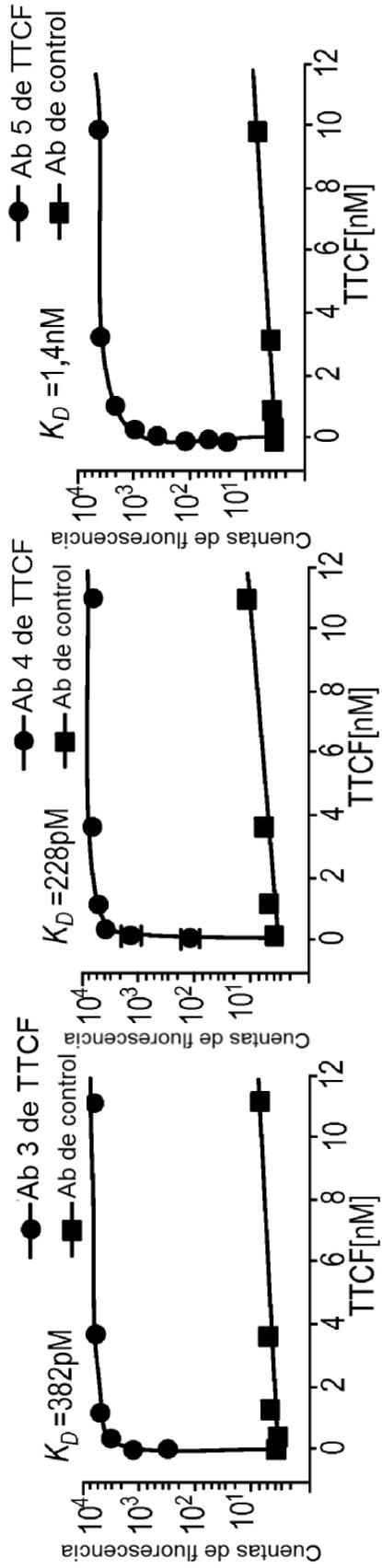


FIG. 23B

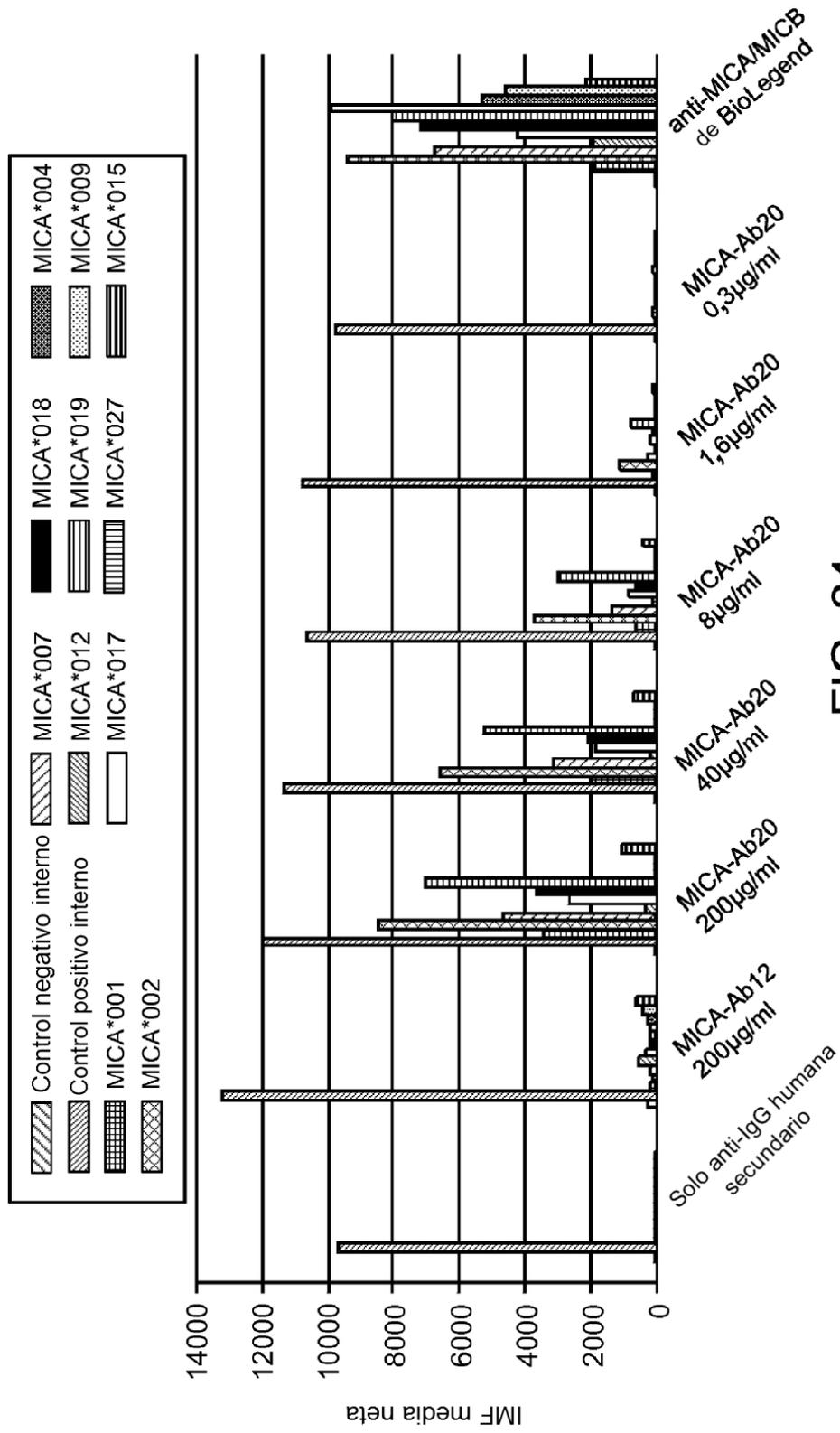
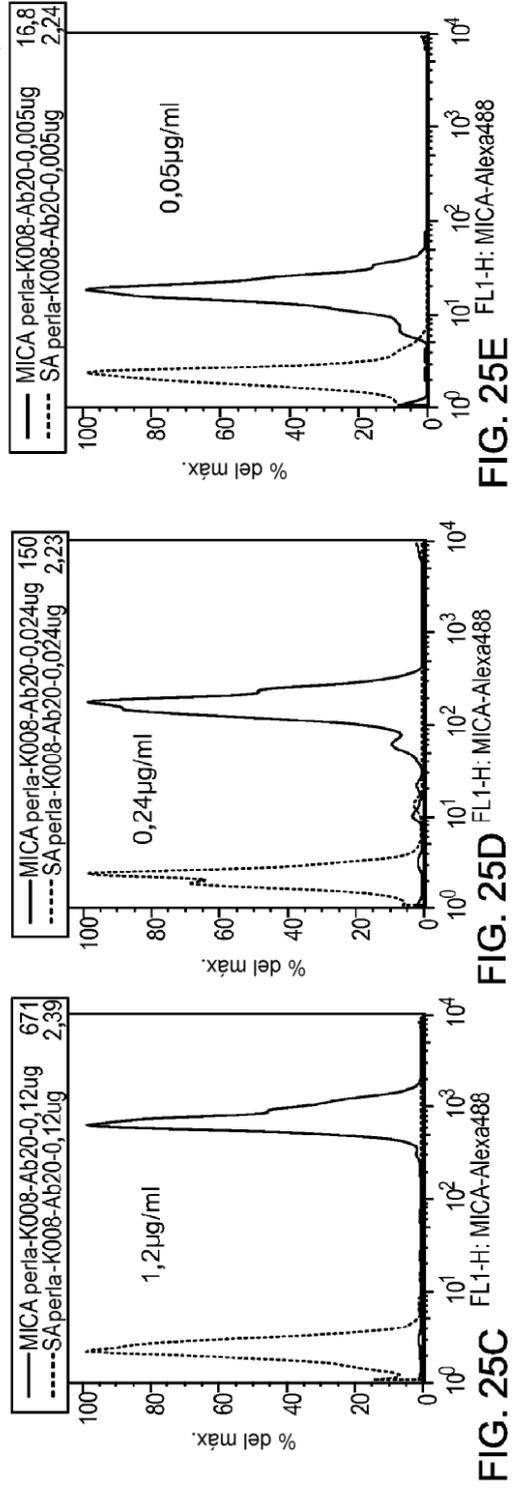
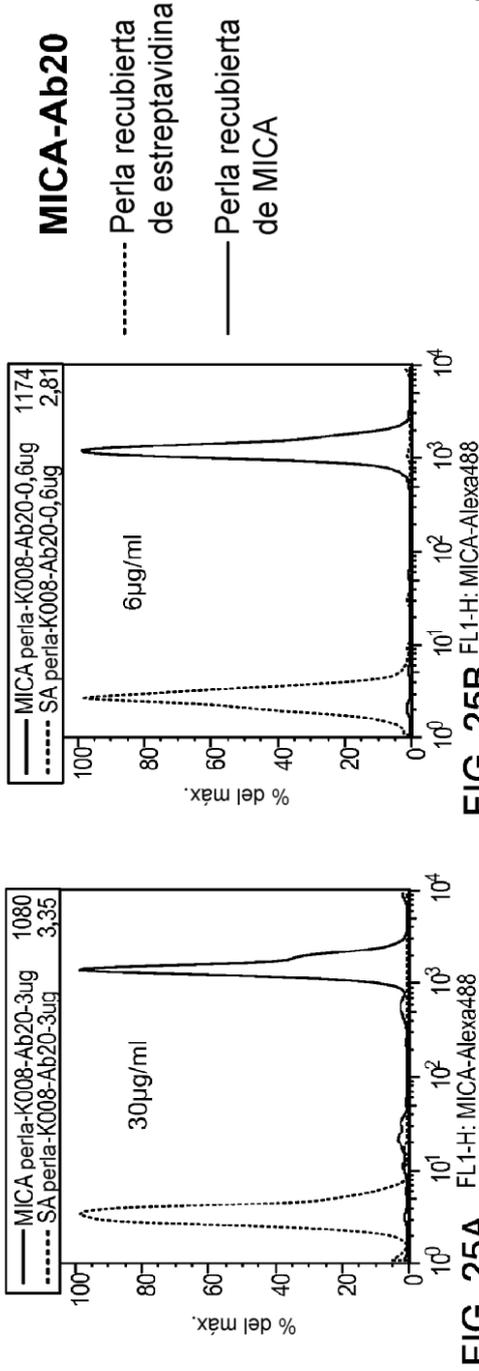
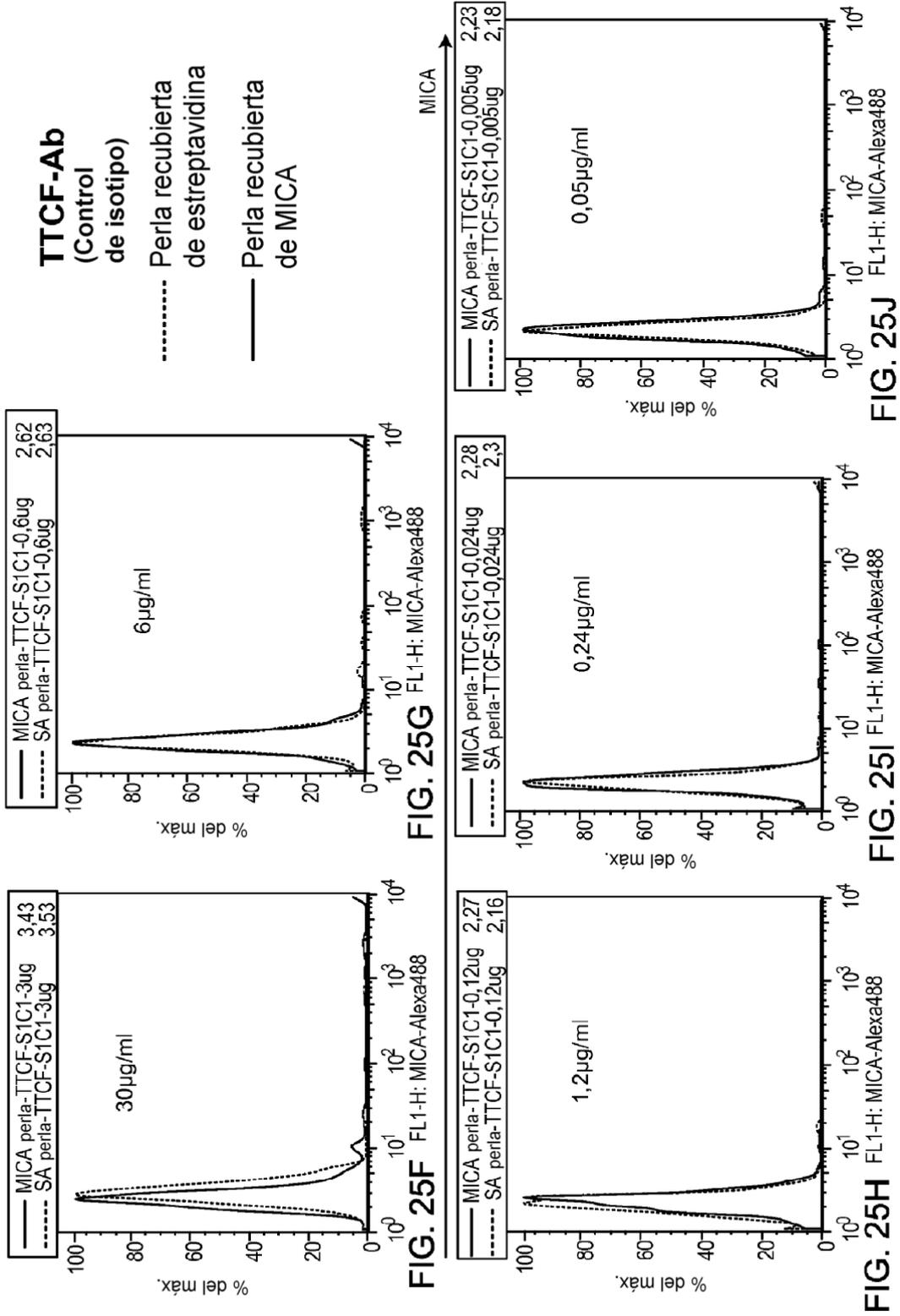


FIG. 24





Anti-MICA/B de BioLegend

- Perla recubierta de estreptavidina
- Perla recubierta de MICA

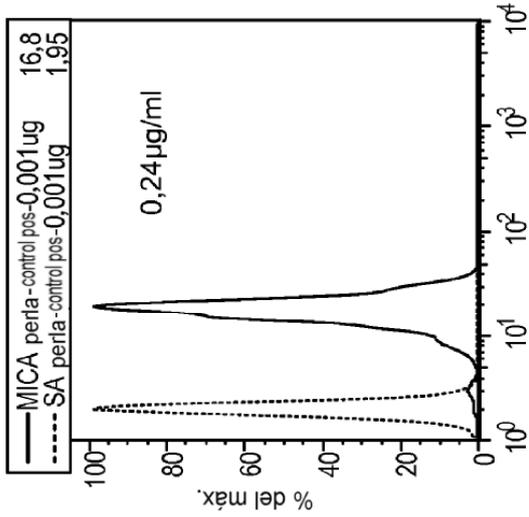


FIG. 25L

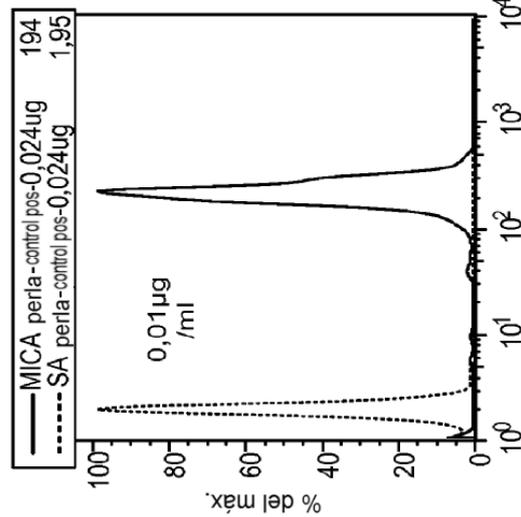


FIG. 25N

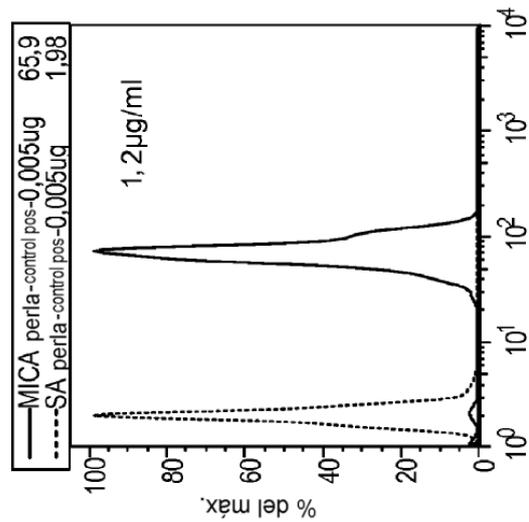


FIG. 25K

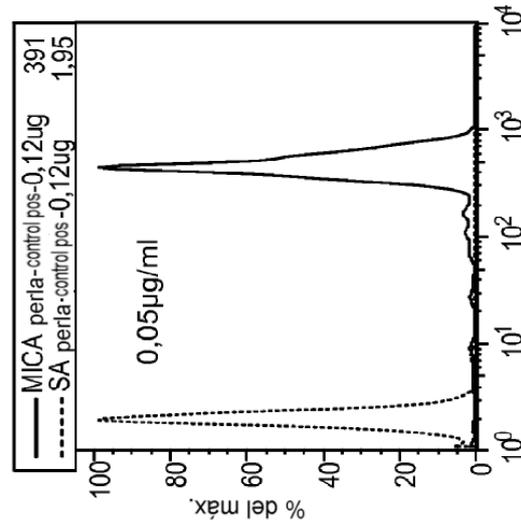


FIG. 25M

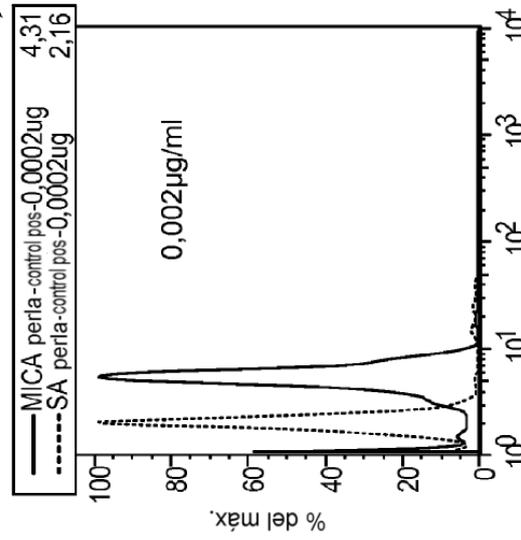
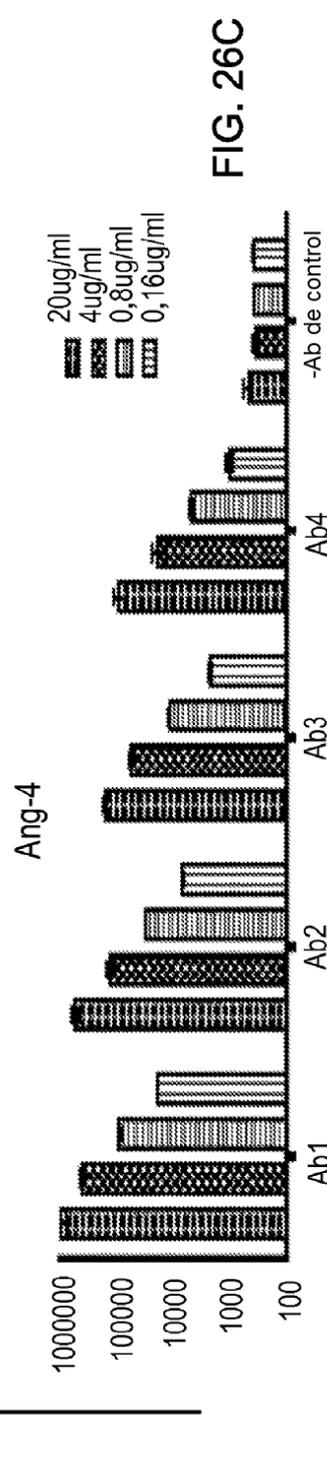
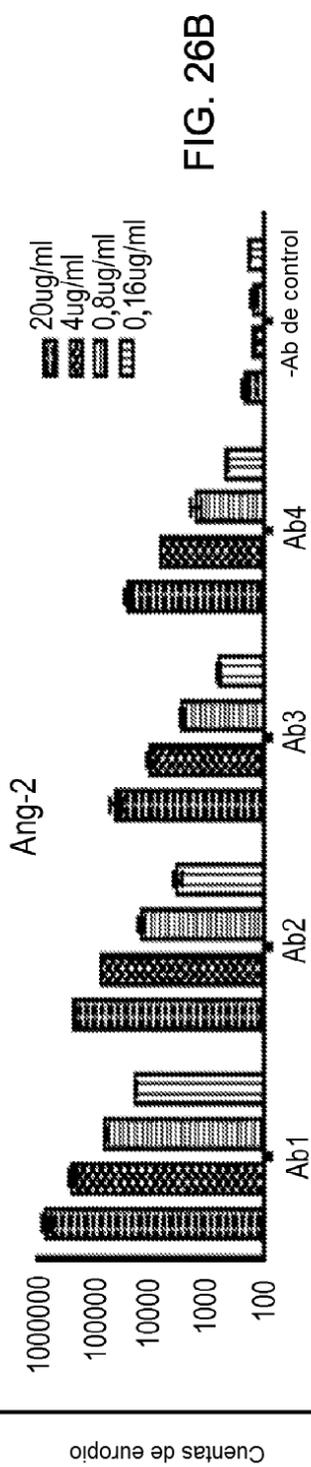
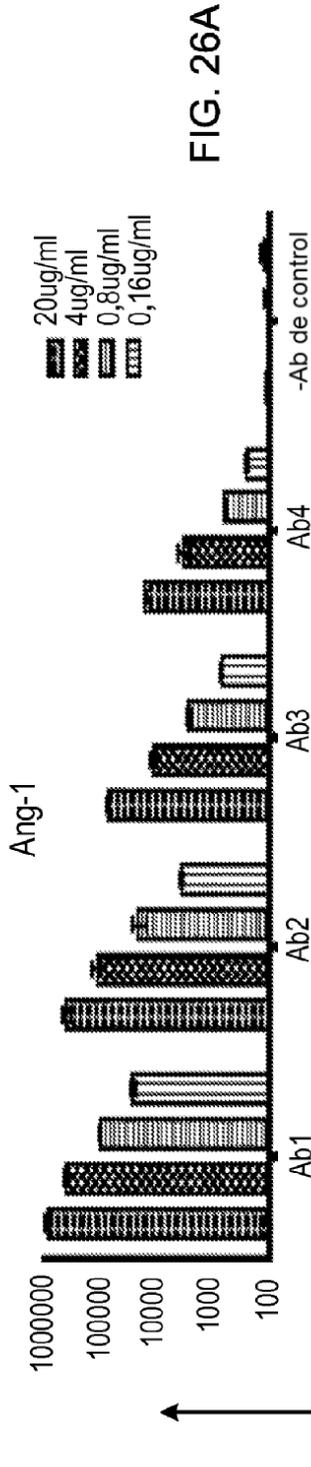


FIG. 25O



Cuentas de europio



FIG. 26D

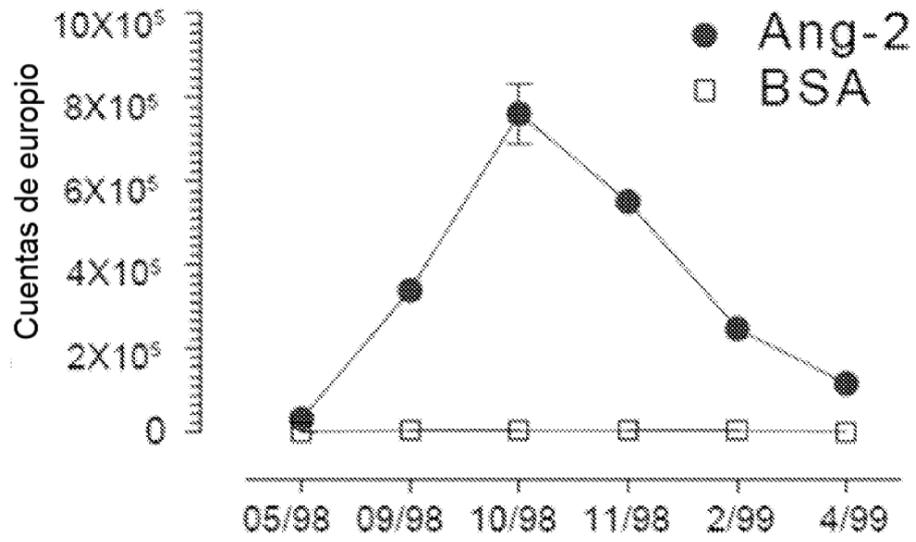


FIG. 27A

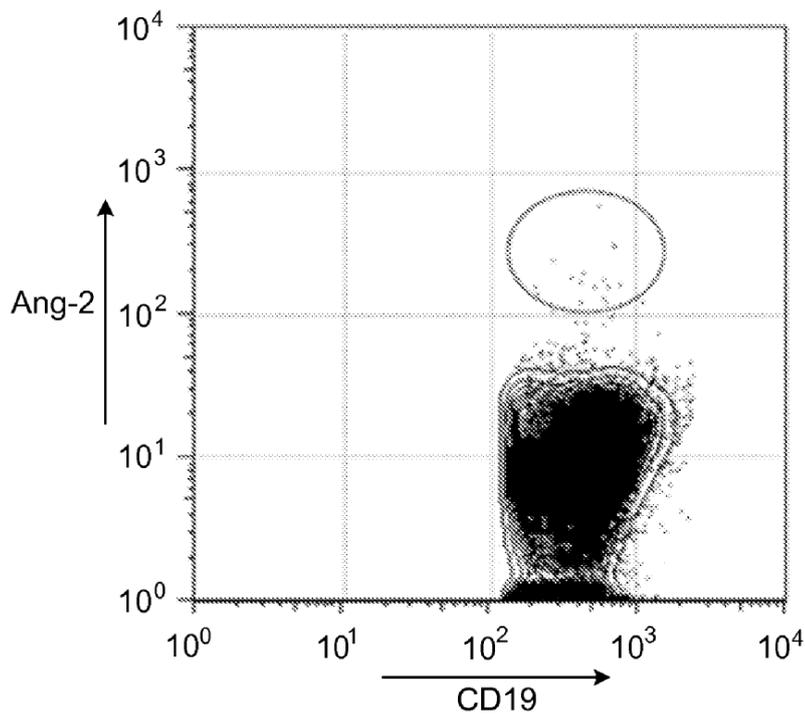


FIG. 27B

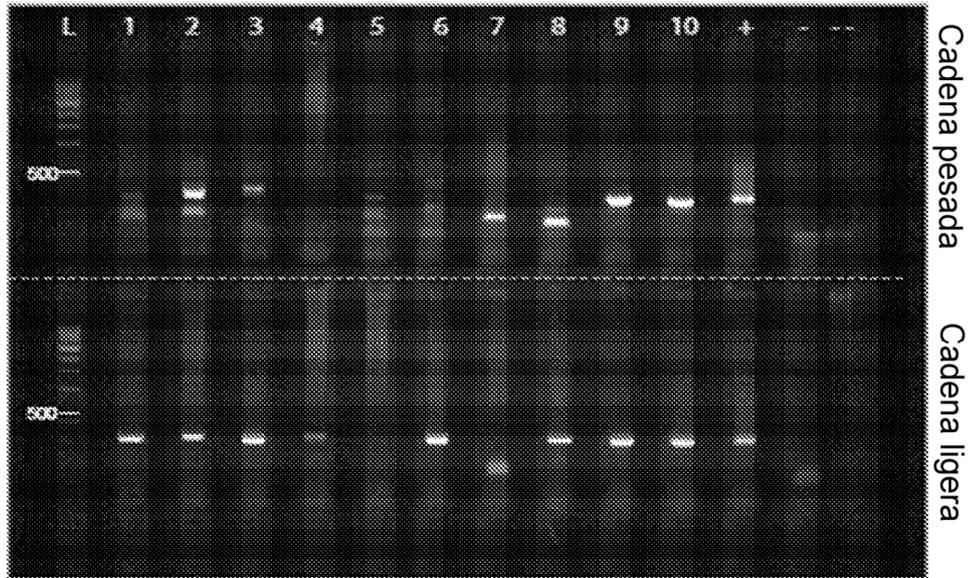


FIG. 27C

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGGAGCCCTTCGGGGACCCCTGTCCCT
CACCTGCACTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGGAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCC
AGCCCCAGGGAGGGCTGGAATGGATGGAGAAATCCATCACATTTGGAGGTTCCAGC
TACAAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAATGCTGTAGACAAGTCCCAGAACCAGTT
CTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCCGCCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAA
ATGGCTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGGACCACGGTCACCCGTCCTCCTCG
(SEQ ID NO. 148)

FIG. 28

QVQLQESGPGGLVEPSGTLSLTCTVSGGSISRSNWWSWVRQPPGEGLEWIGEIHHIGRSS
YNPSLKSRVTMSVDKSNQFSLRLTSVTAADTAVYYCAKNGYYAMDVWGQGTTVTSS
(SEQ ID NO. 149)

FIG. 29

GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGAGTGTAGCAGCGACTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTACGCTACATCCTTCAGGGCCACTGGCATT
 TCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCTCTCACCATCAACAGACT
 GGAACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTTCAGCACATATCGTAGTTCACCTCCGTGGT
ACACTTTTGCCCCAGGGACCAAGCTGGACATGAGACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTGC
 (SEQ ID NO. 150)

FIG. 30

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSDFLAWYQQKPKGQAPRLLIYATSFRAITGI
 SDRFSGSGGTDFSLTINRLEPEDEFAVYYCQHYRSPPPWYTFAAQGTKLDMRRTVAAPSV
 (SEQ ID NO. 151)

FIG. 31

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCCTGTCCCTC
 ACCTGGCCTGTCTCTGGTGCCTCCATTACCAATGGTGCCTGGTGGAGTTGGGTCCGGCCAG
 CCCCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCTATCTTAATGGGAACACCAACTCC
 AACCCGTCCTGAAGAGTCGAGTCATCATATCAGTGGACAAGTCCAAGAACCACCTTCTCG
 CTGACCCCTGAACTCTGTGACCGCCGGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAGAAGCGCT
GCCTACAACCTTGAGTTCTGGGCCAGGGAGCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:

167)

FIG. 32

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGASITNGAWWSWVRQPPGKGLEWIGELYLNQNTNS
 NPSLKSRIISVDKSKNHFSLTLNSVT AADTAVYYCAKNAAYNLEFWGQGalVTVSS (SEQ

ID NO: 168)

FIG. 33

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCCCCCTACGTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
 CGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCCATCCACCAGGGCCACCCTCCAG
 ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
 CTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTCTCAGCAGTATGATAGATCATACTATTACACTTTT
 GGCAGGGACCAAGCTGGAGATCAA (SEQ ID NO: 169)

FIG. 34

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSPYVAWYQQKRGQAPRLLIYGASTRATGIPDR
 FSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSYYTFEFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 170)

FIG. 35

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAACCTGTGGCTC
ACCTGCACTGTCTCTGATGCCCTCCATGACTGATTATCACTGGAGCTGGATCCGGCAGGCC
GCCCCGAAGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATGTACAGCACTGGGAGTCCCTACTACAA
ACCCCTCCCTCAAAGGTCGGGTCACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTCTCCCT
GAAGCTGGCCCTCTGTGACCCCGGCAGACACGGCCATCTATTATTGTGGAGCGGACAACA
TATTGGTGGCTGGGTCCCCCTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCCTC
A (SEQ ID NO: 185)

FIG. 36

QVQLQESGPGLVKPSENLSLTCTVSDASMSDYHWSWIRQAAGKGLEWIGRMYSTGSPYY
KPSLKGRVTMSIDTSKNQFSLKLASVT AADTAIYYCASGQHIGGWVPPDEFWGGQLVTVS
S (SEQ ID NO: 186)

FIG. 37

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTTGGACAGCCGGCCCTCCA
 TCTCCTGCAGGTCTAGTGAGGCCCTCGTATATAGTGATGGAGACACCTACTTGAGTTGGT
 TTCACCAGAGCCAGGCCAGCCCTCCAAGACTCCTGATTTATAAAATTCTAACCCGGTTCT
 CTGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCAGTGGGCAGGCACAGATTTCACACTGAAAAATCA
 GCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACATTTTCCGT
GGACGTTGGCCAGGGACCAAAGTGGAAGTCAAACGT (SEQ ID NO: 187)

FIG. 38

DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSEGLVYSDGDTYLSWFHQRPQPRLLIYKISNRFSG
 VPDRFSGGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCYCMQATHFPWTFGGQGTKVEVKR (SEQ ID NO:
 188)

FIG. 39

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGACGCCTCTGGATTACACCTTTAGTTCATATGGCTTGACCTGGATACGCCAGGCT
 CCGGGGAAAGGCCCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGCAGTGGCAATAACACATACTA
 CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAAGTCAAGAAGACACTATA
 TCTACAAATGGACAGCCTGACAGTCGGAGACACGGCCGTCTATTACTGCTTAGGAGTCCGG
TCAGGGCCACGGAATTCCGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 203)

FIG. 40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESSYGLTWIRQAPGKGLEWVSSISGSGNNTYYA
 DSVKGRFTISRDKVKKKTLYLQMDSLTVGDTAVYYCLGVGQGHGIPVIVSS (SEQ ID NO.
 204)

FIG. 41

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCCTCACCTGTCAACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA
 TCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCGTACACCGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGT
 TTCTGCAGAGGCCAGGCCAGGCTCCAAGACTCCTAATTTATCGGATTTCTAACCCGGTTCT
 CTGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGCAGGGACGGGATTTCACACTGAAAATC
 AGCAGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGCGTTTACTACTGCATGCAAGCTACACAAATCGCC
AACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO. 205)

FIG. 42

DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSOSLVHRDGNNTYLSWFLQRPQGAPRLLIYRISNRFSG
 VPDRFSGGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQIPNTEGGQTKLEIK (SEQ ID NO.
 206)

FIG. 43

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAATCCAGCCGGGGGGTCCCTAAGACT
 CTCCCTGTCAGCCCTCGGGCTTCCTCATCAGTAGTTATTTTCATGAGCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGCCGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGATGGTAGTACATAATTAC
 GTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCACAGACAATTCCAAGAACACACTATA
 TCTTCAGATGAACAGCCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGATATTACTGTGCCGACACGGC
ATTTGAATTATGACGGTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCCGTCTCCTCAGCC
 TCCACCAAG (SEQ ID NO: 221)

FIG. 44

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFLISSYFMSWVRQAPGKGPVSVIYSDGSTYY
VDSVKGRFTISDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYYCATRHLNLDGDHWGQGLTVVSSA
 STK (SEQ ID NO: 222)

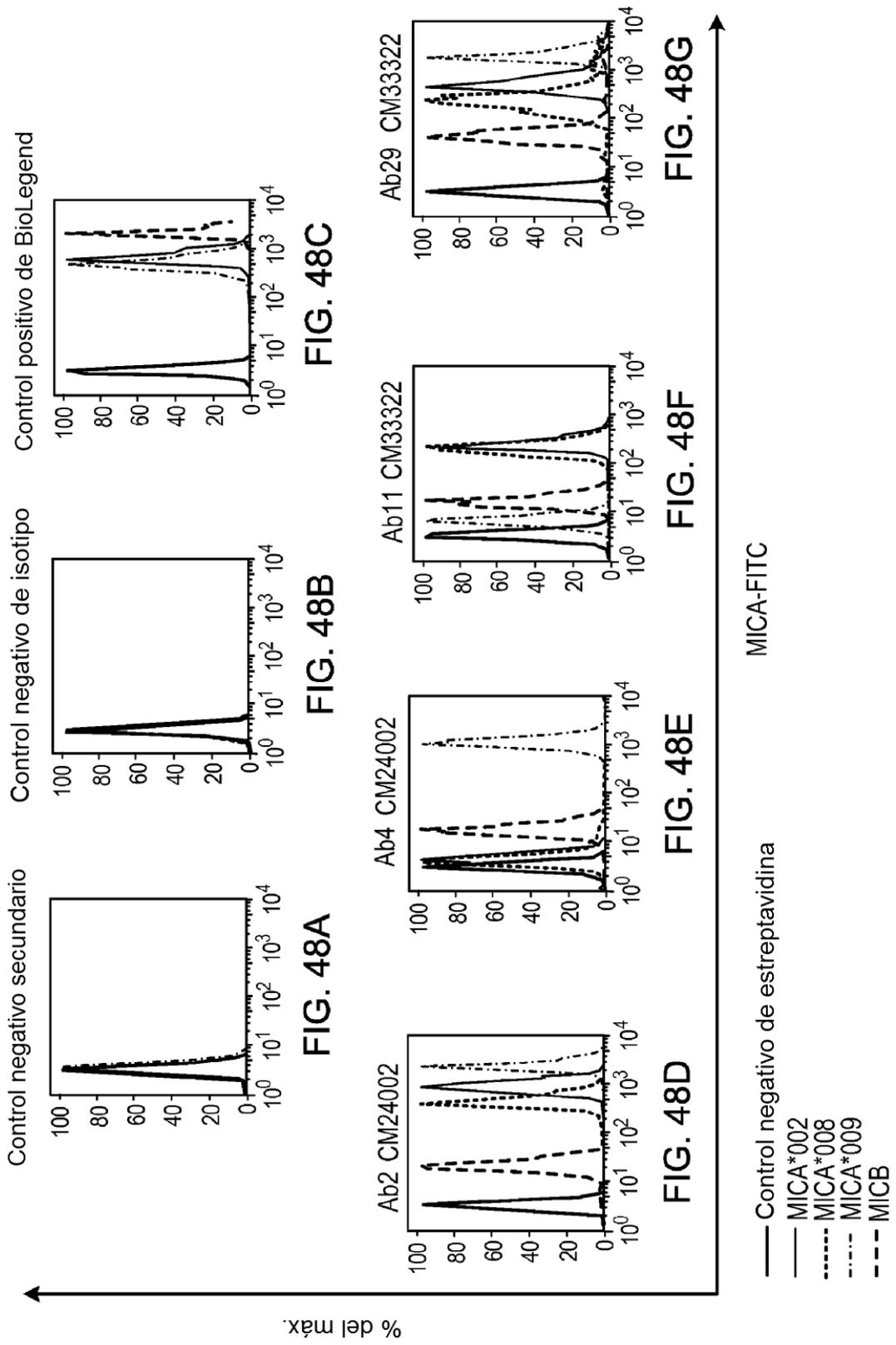
FIG. 45

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCTTGGACAGCCGGCCCTC
 CATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACACAGTGACGGAAACACCTACTTGAATT
GGTTTACCCAGAGCCAGGCCAATCTCCAAGGCCCTAATTTATAAGGTTTCTAAGCCGG
 GACTCTGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGTCAAGTAGTGATTTCACACTGAA
 AATCAGCAGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTTATTACTGCATGCAAGGTACACATT
GGCCGACGTTTCGGCCAAGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCA (SEQ
ID NO: 223)

FIG. 46

DVVMTQSPILIPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYILNWFHQRPQQSPRRLLIYKVSKR
 DSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPTFGQGTKVEIKRTVAA
 (SEQ ID NO: 224)

FIG. 47



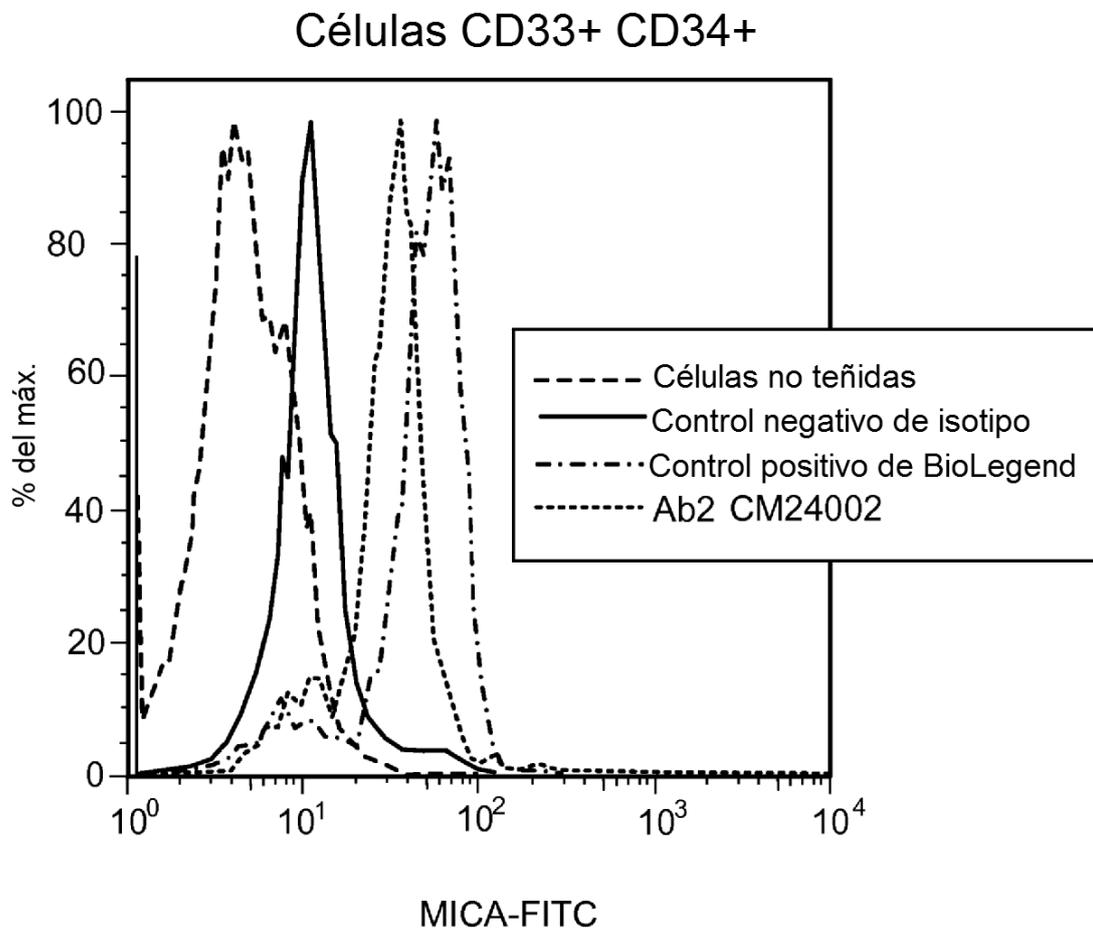
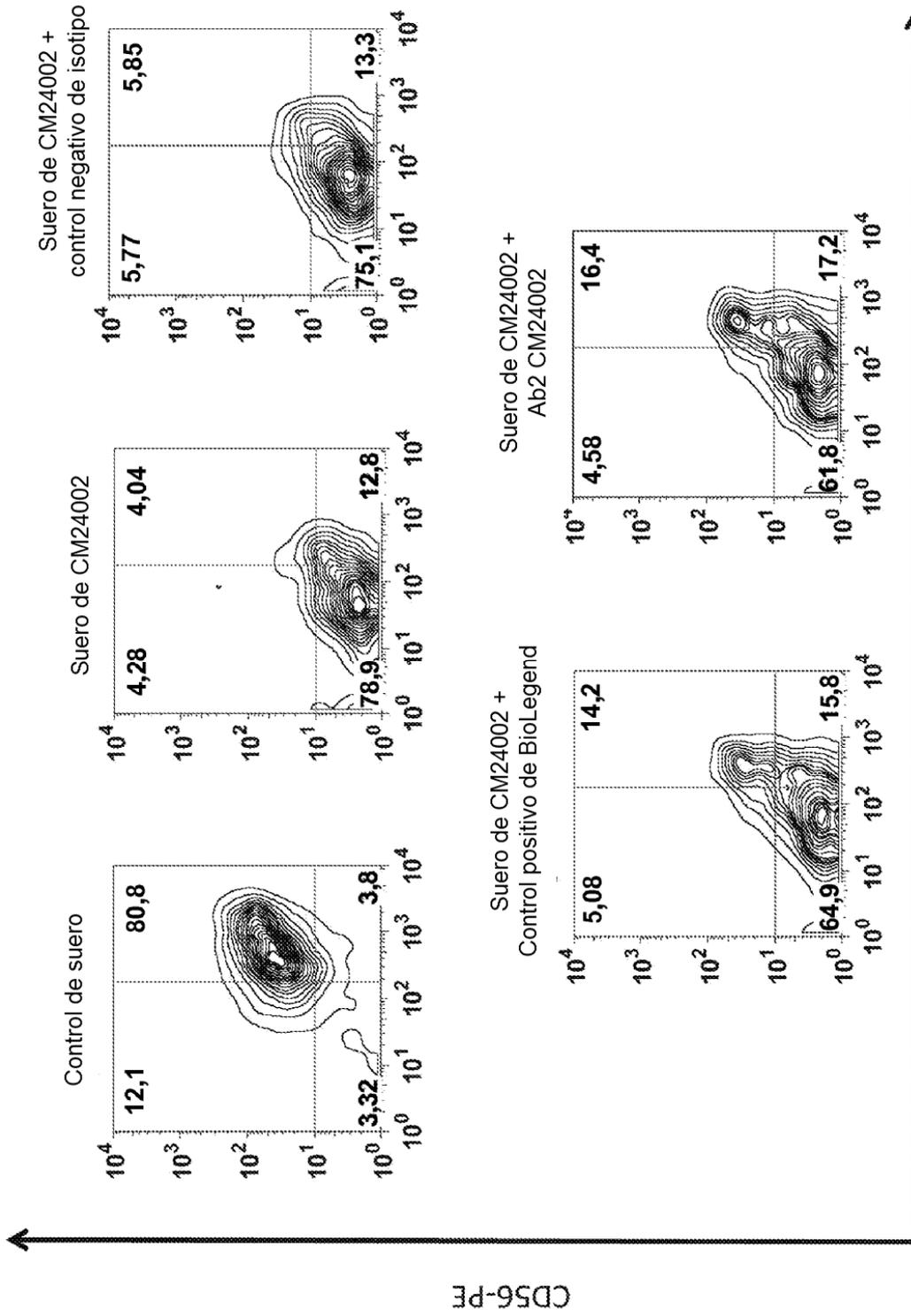


FIG. 49



NKG2D-APC
FIG. 50

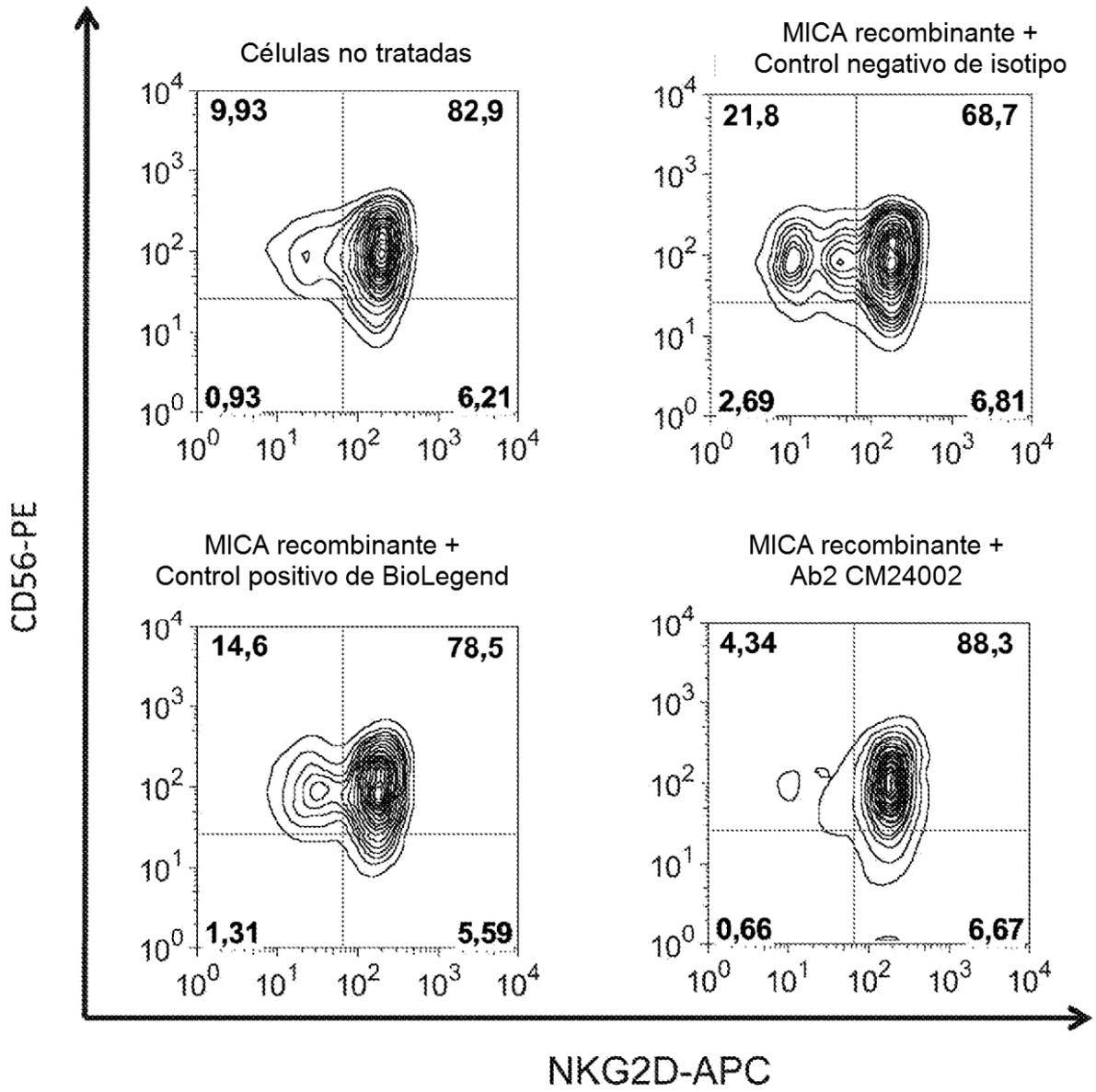


FIG. 51

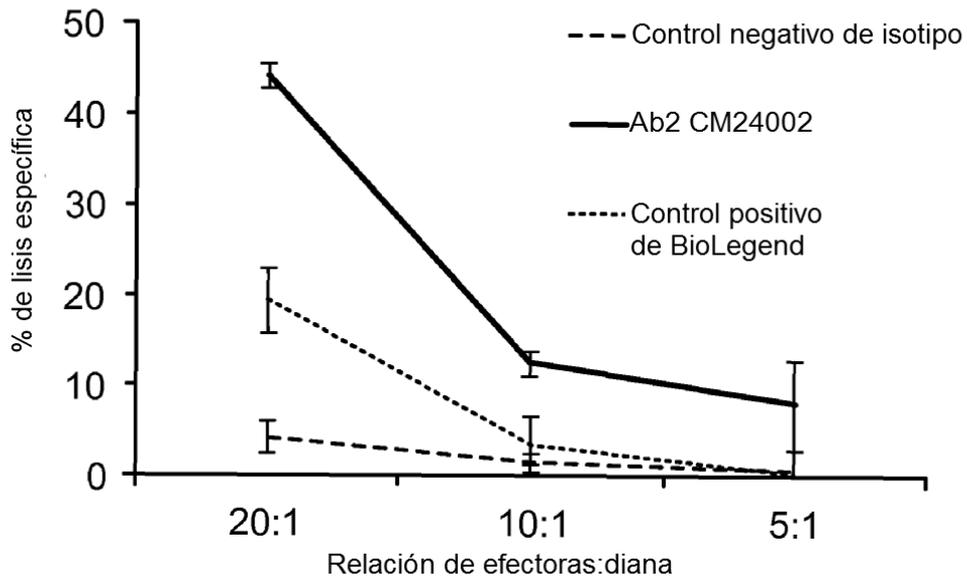


FIG. 52

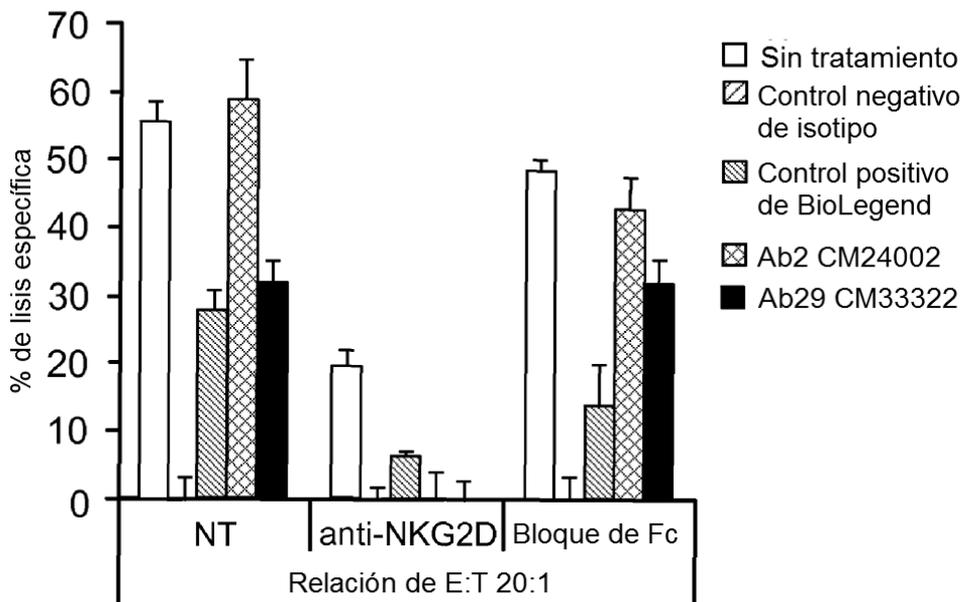


FIG. 53

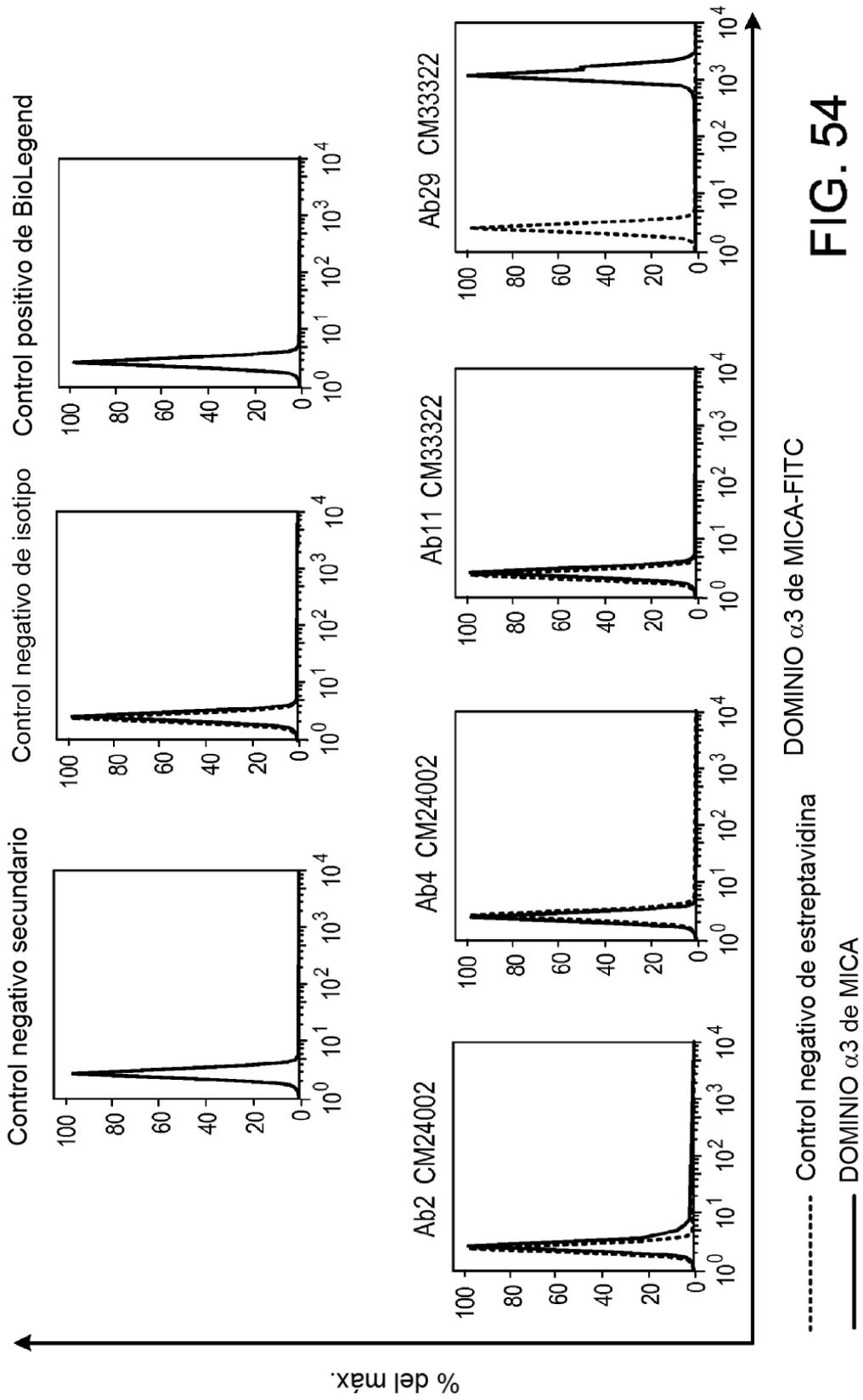


FIG. 54

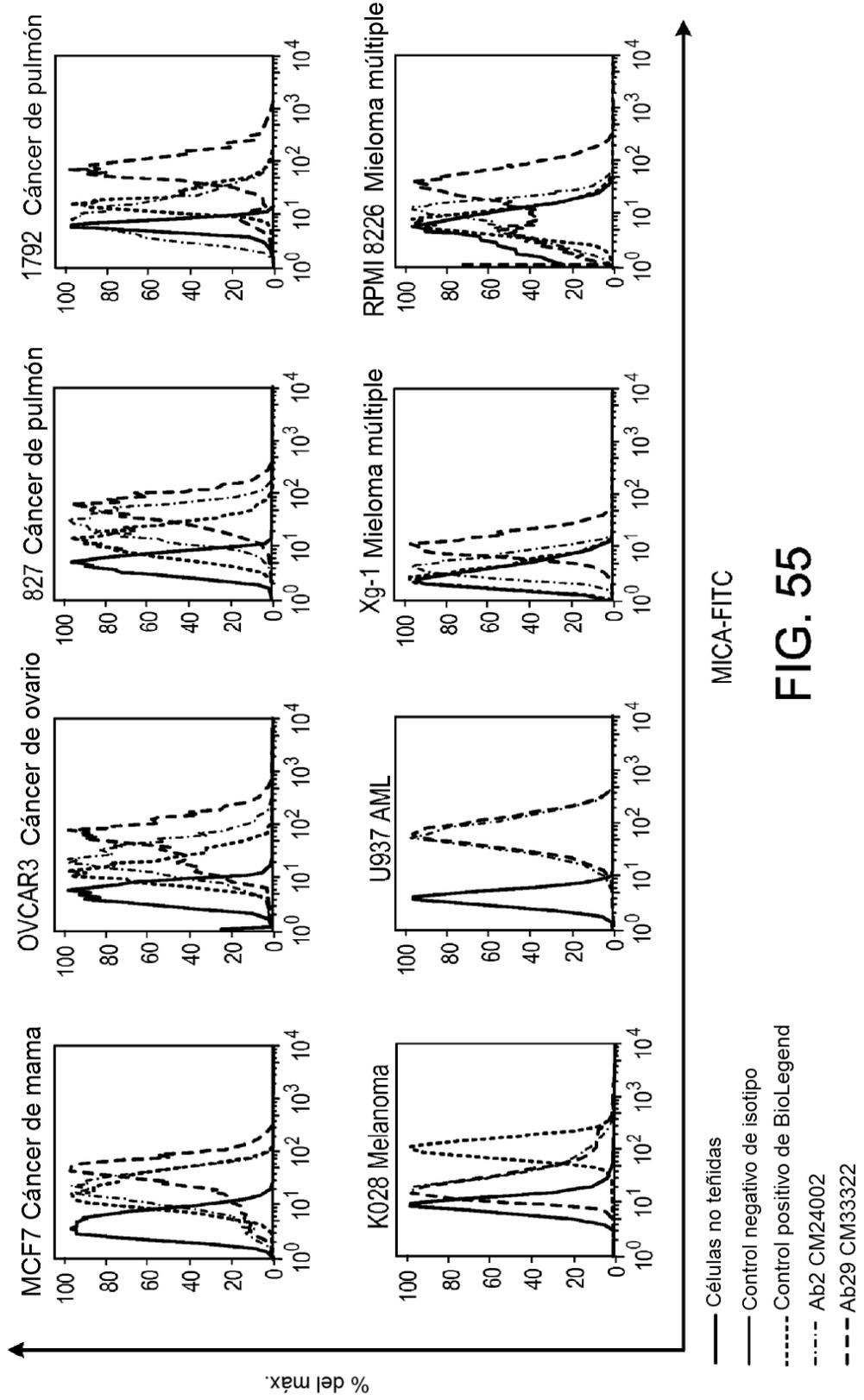


FIG. 55

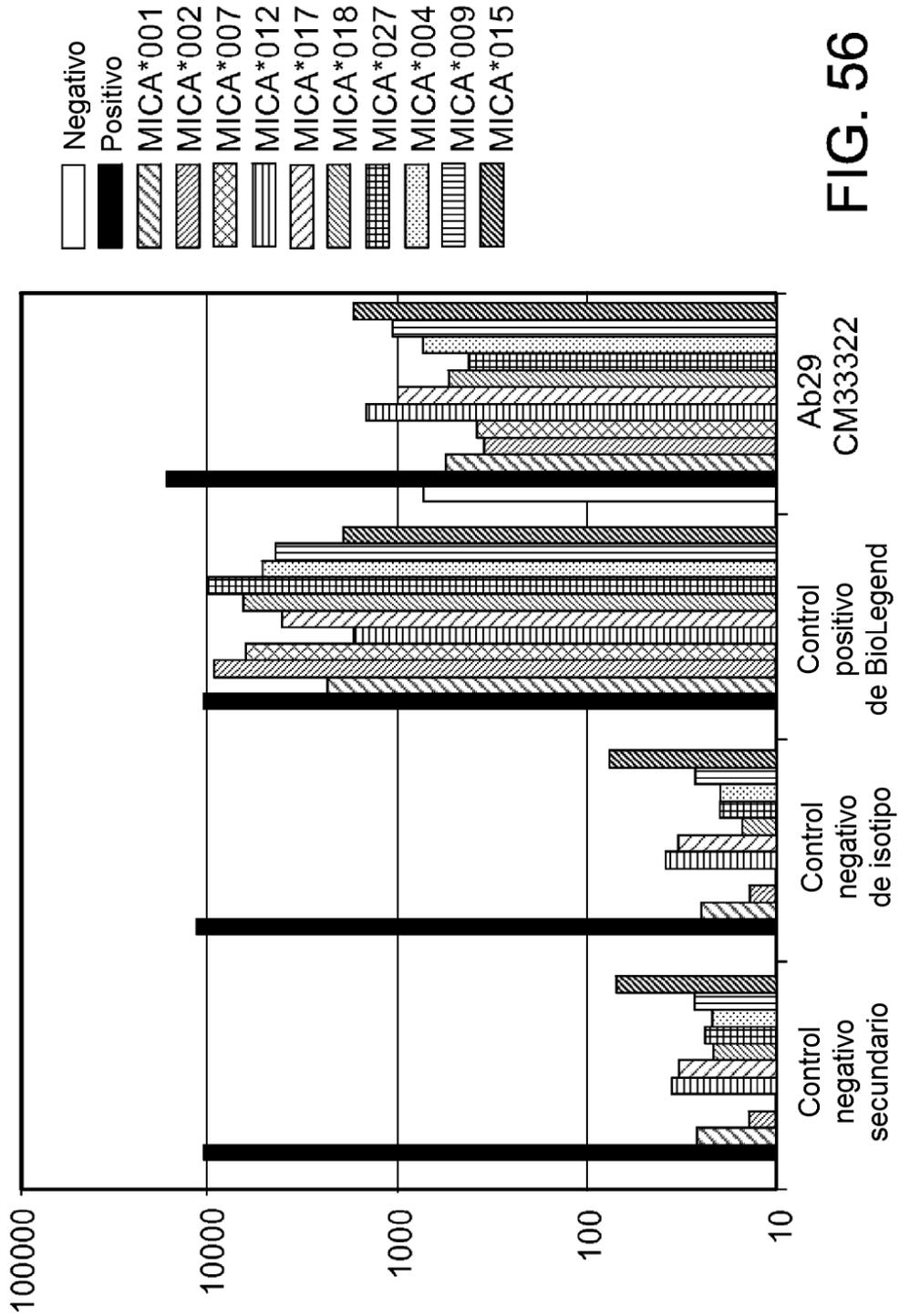


FIG. 56

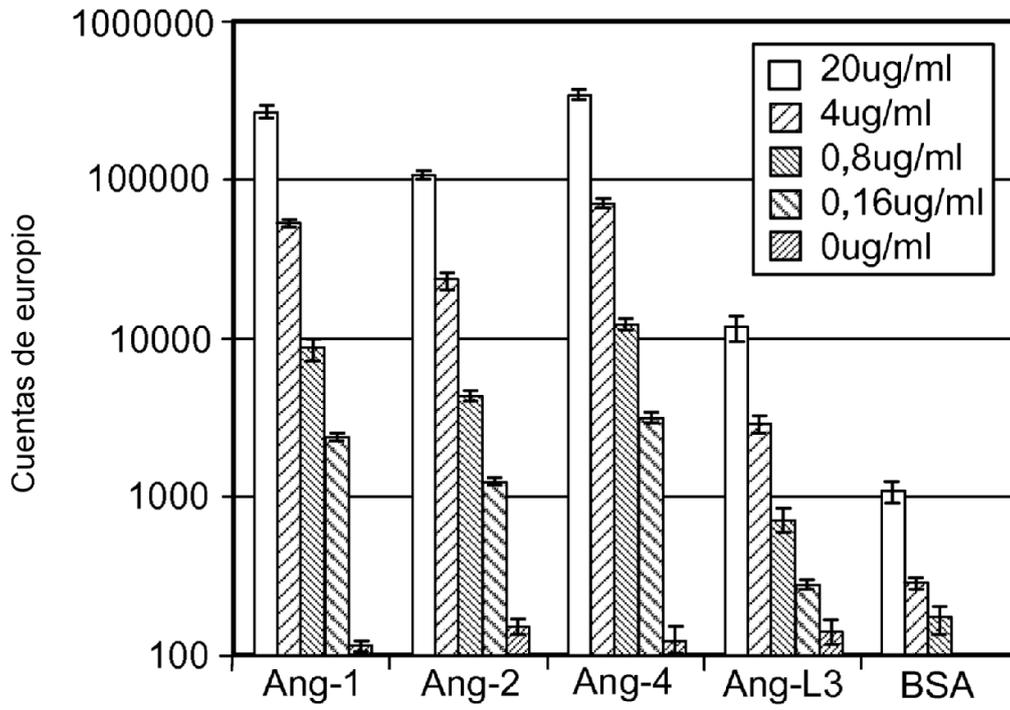


FIG. 57