

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 330**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2015 E 18212801 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3480213**

54 Título: **Polipéptidos syntac y usos de los mismos**

30 Prioridad:

18.06.2014 US 201462013715 P

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

01.07.2020

73 Titular/es:

**ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE
(100.0%)**

**1300 Morris Park Avenue
Bronx, NY 10461, US**

72 Inventor/es:

**SEIDEL, RONALD, D., III;
CHAPARRO, RODOLFO, J.;
HILLERICH, BRANDAN, S.;
GARFORTH, SCOTT, J. y
ALMO, STEVEN, C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 770 330 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

Polipéptidos syntac y usos de los mismos

5 Introducción

A lo largo de toda esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones entre corchetes. Las citas completas de estas referencias se pueden encontrar al final de la

10 El rápido progreso durante la última década en el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento para el descubrimiento de biomarcadores clínicamente relevantes ha sido paralelo al desarrollo gradual y la aplicación de productos biológicos, fármacos en los que el principio activo es producido o extraído de una fuente biológica (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, proteínas terapéuticas y péptidos), y ha revolucionado el tratamiento de afecciones inmunes. Sin embargo, las terapias biológicas actuales están impulsando acciones reguladoras de seguridad al doble de la tasa de sus homólogos sintéticos (17 % para productos biológicos, 8,5 % sintéticos) [1]. Se cree que esto se manifiesta a partir del modo de acción de estos productos biológicos inmunomoduladores: inmunosupresión *global* en el caso de autoinmunidad (por ejemplo, Humira [2]) e inmunoestimulación *global* para el tratamiento de cánceres (por ejemplo, Yervoy [3]). Estos tratamientos no restringen adecuadamente la inmunomodulación a las células patógenamente relevantes y, como resultado, predisponen a los pacientes a infecciones potencialmente *mortales* y a una serie de efectos secundarios problemáticos [4-6]. Además, la eficacia moderada y los perfiles de seguridad de estos fármacos [7] han provocado una tendencia reciente hacia los productos terapéuticos dirigidos. Los productos biológicos "dirigidos" de primera generación dirigen sus efectos sobre subconjuntos de linfocitos T más restringidos (por ejemplo, anticuerpos y proteínas terapéuticas tales como anti-4-1BB, anti-CD27, LAG-3 y TIM-3) [8-11]. Sin embargo, al igual que las terapias anteriores, estos esfuerzos de "1ª generación" siguen siendo incapaces de atacar solo las células relevantes para la enfermedad.

En el núcleo de los eventos moleculares que comprenden una respuesta inmunológica adaptativa está el acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR) con un pequeño antígeno peptídico presentado de forma no covalente por una molécula principal del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esto representa el mecanismo de direccionamiento del sistema inmunitario y es una interacción molecular necesaria para la activación de los linfocitos T y la función efectora. Después del direccionamiento de células específicas de epítipo, los linfocitos T reclutados se activan a través de la participación general de moléculas coestimuladoras que se encuentran en la célula presentadora de antígeno. Ambas señales son necesarias para impulsar la especificidad de los linfocitos T y la activación o la inhibición. Es importante destacar que durante el desarrollo de los linfocitos T,

un proceso de edición genómica da como resultado la expresión de un TCR único en cada célula T [12], mientras que la molécula coestimuladora generalmente se expresa en todos los linfocitos T (o "subconjuntos" de linfocitos T grandes). Los enfoques actuales dependen casi exclusivamente del acoplamiento general de la molécula coestimuladora, dando como resultado "terapias globales". Estas inmunoterapias globales son increíblemente potentes pero se dirigen indiscriminadamente a los linfocitos T, lo que conduce a una toxicidad significativa. Si las moléculas coestimuladoras pudieran unirse preferiblemente a los linfocitos T portadores de TCR relevantes para la enfermedad, su potencia avanzaría de un compromiso a una resistencia.

Existen varios enfoques para la modulación de linfocitos T, que incluyen el uso de moléculas coestimuladoras solubles generalmente expresadas como fusiones de Fc o anticuerpos dirigidos a moléculas coestimuladoras capaces de bloquear la función coestimuladora [13, 14], conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) [15], anticuerpos biespecíficos (BsAbs) [16, 17] y antígenos peptídicos libres [18]. En particular, los ADC (a menudo denominados balas mágicas) prometen la administración dirigida de toxinas (u otras cargas útiles de fármacos) directamente a las células patológicas. Sin embargo, los ADC actualmente adolecen de una falta de biomarcadores preferidos para el direccionamiento de anticuerpos y tasas de internalización deficientes, ya que solo ~1,5 % de la dosis administrada se encuentra dentro de las células tumorales, y a menudo se requiere internalización para la destrucción celular. Los anticuerpos biespecíficos proporcionan una oportunidad atractiva para combinar los efectos aditivos y sinérgicos de múltiples mAb, y pueden usarse para puentear las células tumorales con los linfocitos T [17] y, por lo tanto, no requieren internalización para generar una respuesta. Aunque los anticuerpos biespecíficos se han desarrollado para tener interacciones bivalentes con dos antígenos diferentes [19], estas construcciones aún carecen de modularidad y padecen una afinidad reducida en comparación con el mAb parental [20]. La terapia de linfocitos T adoptivos (CAR-T) aborda parcialmente estos problemas y es una alternativa atractiva a las terapias tradicionales descritas anteriormente [21]. CAR-T utiliza linfocitos T primarios genéticamente modificadas que llevan receptores de antígeno quimérico (CAR) en su superficie: los linfocitos T del paciente se extraen, se purifican y se modifican genéticamente para dirigirse a antígenos específicos de tumor a través del uso de CAR. El CAR generalmente tiene un dominio variable externo monocatenario (un fragmento de anticuerpo) que se dirige a las células patológicas pero alberga dominios citoplasmáticos de moléculas coestimuladoras tradicionales. Una vez que los linfocitos T manipulados se unen al antígeno objetivo, los dominios estimuladores internos proporcionan las señales necesarias para que los linfocitos T se vuelvan completamente activos. En este estado completamente activo, los linfocitos T pueden proliferar y atacar con mayor eficacia a las células cancerosas. La moderación de esta respuesta para evitar el síndrome de liberación de citocinas y los efectos secundarios asociados, junto con problemas de escalabilidad (por ejemplo, el gasto significativo

y la dificultad asociada con la extracción y modificación de linfocitos T) actualmente evitan que esta tecnología entre en el uso convencional [22].

Los productos biológicos, también conocidos como productos biofarmacéuticos, son fármacos en los que el principio activo es producido o extraído de una fuente biológica (en contraste con los fármacos de "molécula pequeña"). Los productos biológicos son adiciones relativamente recientes al mercado terapéutico global, siendo en su mayor parte proteínas recombinantes producidas mediante ingeniería genética; estos incluyen anticuerpos monoclonales, proteínas terapéuticas y péptidos. La mayoría de los fármacos biológicos actualmente comercializados se usan para aliviar a los pacientes que padecen enfermedades crónicas, tales como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, infertilidad y fibrosis quística. El mercado mundial de productos biológicos se valoró en 163 billones de dólares en 2012 y se espera que alcance 252 billones de dólares en 2017, lo que respaldará una tasa de crecimiento anual del compuesto de cinco años del 9 %. Impulsar este crecimiento es la necesidad de una cartera de fármacos más extensa, la identificación de objetivos atractivos contra enfermedades desafiantes y un impulso para buscar productos biológicos de seguimiento (biosimilares, productos biológicos genéricos) ilustrados por la reciente introducción de una ruta abreviada de aprobación de la FDA.

La presente invención aborda la necesidad de terapias de precisión para productos terapéuticos personalizados de autoinmunidad e inmuno-oncología que se dirigen clonalmente solo a los linfocitos T relacionados con la enfermedad para la regulación ascendente (por ejemplo, en el caso del cáncer) o la supresión (por ejemplo, en el caso de autoinmunidad) en oposición a los moduladores globales y "pseudodirigidos" actualmente en el mercado o en desarrollo.

Resumen

Esta invención proporciona un polipéptido multimérico que comprende un polipéptido heterodimérico que comprende

(a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) un epítipo peptídico; y

ii) un primer polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II;

b) un segundo polipéptido que comprende un segundo polipéptido del MHC de clase II, y

c) al menos un polipéptido inmunomodulador,

donde el primer y/o el segundo polipéptido comprende el al menos un polipéptido inmunomodulador, donde el epítipo peptídico es un epítipo de un autoantígeno y, opcionalmente, donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o un andamiaje no Ig.

La invención proporciona además un método de inhibición selectiva de la actividad y/o reducción del número de un linfocito T autorreactivo, comprendiendo el método poner en contacto el linfocito T *in vitro* con el polipéptido multimérico de la invención, donde dicho contacto inhibe selectivamente la actividad y/o reduce el número de linfocitos T autorreactivos.

La invención también proporciona una composición que comprende el polipéptido multimérico de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Esta divulgación también proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia líder de B2M contigua a un epítipo peptídico candidato contiguo a una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos con una segunda secuencia líder de B2M contigua a una secuencia peptídica del dominio modulador de linfocitos T contigua a un tercer enlazador de aminoácidos contiguo a una secuencia de aminoácidos idéntica a una cadena pesada MHC contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina.

También se proporciona un método para inhibir un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para inhibir un clon de linfocitos T.

También se proporciona un método para tratar un trastorno autoinmune inhibiendo un clon de linfocitos T autorreactivo que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para tratar un trastorno autoinmune.

También se proporciona un método para estimular un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para estimular un clon de linfocitos T.

También se proporciona un método para tratar un cáncer estimulando un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico en un cáncer que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

También se proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a un péptido del dominio modulador de linfocitos T, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina.

También se proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) un péptido del dominio modulador de linfocitos T contiguo a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina.

También se proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes descritas en el presente documento unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

También se proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes descritas en el presente documento unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

Esta divulgación proporciona una célula adaptada a la suspensión aislada transducida por o transfectada con un ácido nucleico heterólogo que comprende, en orden de 5' a 3', una secuencia que codifica un polipéptido recombinante como se describe en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia líder de B2M contigua a un péptido de epítipo candidato contiguo a una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia peptídica del dominio modulador de linfocitos T contigua a un tercer enlazador de aminoácidos contiguo a una segunda secuencia líder de B2M contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una cadena pesada MHC contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunos casos, el epítipo candidato comprende 7-20 aminoácidos. En algunos casos, el tercer enlazador de aminoácidos es autoescindible. En algunos casos, el segundo enlazador de aminoácidos es autoescindible. En algunos casos, el péptido de autoescisión es un péptido viral 2A o tiene la secuencia del mismo. En algunos casos, la primera y/o segunda secuencia líder de B2M tiene la secuencia de la secuencia líder de B2M humana. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una cadena pesada MHC humana. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una molécula MHC I. En algunos casos, la cadena pesada MHC es un HLA-A02:01. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una molécula MHC II. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgA. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgM. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de inmunoglobulina humano. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una etiqueta His-8 contigua al extremo C-terminal del mismo. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio inhibidor. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio estimulador. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo, un ligando peptídico, un péptido coestimulador de linfocitos T, una citocina o una toxina. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T comprende un péptido PD-L1, el dominio variable de Ig de un péptido PD-L1, el dominio modulador de linfocitos T comprende 4-1BBL, el dominio modulador de linfocitos T comprende B7- 1 W88A, o el dominio modulador de linfocitos T comprende Fv monocatenario anti-CD28. En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una mutación en una secuencia de péptido B2M nativa humana del mismo, y en la secuencia de cadena pesada del mismo, para realizar un enlace disulfuro entre la secuencia del péptido B2M y la secuencia de cadena pesada.

La presente divulgación proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos

idéntica a una primera secuencia líder de B2M contigua a un péptido de epítipo candidato contiguo a una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una segunda secuencia líder de B2M contigua a una secuencia peptídica del dominio modulador de linfocitos T contigua a un tercer enlazador de aminoácidos contiguo a una secuencia de aminoácidos idéntica a una cadena pesada MHC contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunos casos, el epítipo candidato comprende 7-20 aminoácidos. En algunos casos, el tercer enlazador de aminoácidos es autoescindible. En algunos casos, el péptido de autoescisión es un péptido viral 2A o tiene la secuencia del mismo. En algunos casos, la primera y/o segunda secuencia líder de B2M tiene la secuencia de la secuencia líder de B2M humana. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una cadena pesada MHC humana. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una molécula MHC I. En algunos casos, la cadena pesada MHC es un HLA-A02:01. En algunos casos, la cadena pesada MHC es una molécula MHC II. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgA. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgM. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de inmunoglobulina humano. En algunos casos, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una etiqueta His-8 contigua al extremo C-terminal del mismo. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio inhibidor. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio estimulador. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo, un ligando peptídico, un péptido coestimulador de linfocitos T, una citocina o una toxina. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T comprende un péptido PD-L1, el dominio variable de Ig de un péptido PD-L1, el dominio modulador de linfocitos T comprende 4-1BBL, el dominio modulador de linfocitos T comprende B7- 1 W88A, o el dominio modulador de linfocitos T comprende Fv monocatenario anti-CD28. En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una mutación en una secuencia de péptido B2M nativa humana del mismo, y en la secuencia de cadena pesada del mismo, para realizar un enlace disulfuro entre la secuencia del péptido B2M y la secuencia de cadena pesada.

En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una mutación en una secuencia de péptido B2M nativa humana del mismo, y en la secuencia de cadena pesada del mismo, para realizar un enlace disulfuro entre la secuencia del péptido B2M y la secuencia de cadena pesada. En algunos casos, la secuencia de cadena pesada es un HLA, y donde el enlace disulfuro se une a uno de los siguientes pares de residuos: residuo B2M 12, residuo HLA 236; residuo B2M 12, residuo HLA 237; residuo B2M 8, residuo HLA 234; residuo B2M 10, residuo HLA 235; residuo B2M 24, residuo HLA 236; residuo B2M 28, residuo HLA 232; residuo B2M 98, residuo HLA 192; residuo B2M 99, residuo HLA 234; residuo B2M 3, residuo HLA 120; residuo B2M 31, residuo HLA 96; residuo B2M 53, residuo HLA 35; residuo B2M 60, residuo HLA 96; residuo B2M 60, residuo HLA 122; residuo B2M 63, residuo HLA 27; residuo B2M Arg3, residuo HLA Gly120; residuo B2M His31, residuo HLA Gln96; residuo B2M Asp53, residuo HLA Arg35; residuo B2M Trp60, residuo HLA Gln96; residuo B2M Trp60, residuo HLA Asp122; residuo B2M Tyr63, residuo HLA Tyr27; residuo B2M Lys6, residuo HLA Glu232; residuo B2M Gln8, residuo HLA Arg234; residuo B2M Tyr10, residuo HLA Pro235; residuo B2M Ser11, residuo HLA Gln242; residuo B2M Asn24, residuo HLA Ala236; residuo B2M Ser28, residuo HLA Glu232; residuo B2M Asp98, residuo HLA His 192; y residuo B2M Met99, residuo HLA Arg234.

En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende una mutación en una secuencia de péptido B2M nativa humana del mismo, y en la secuencia de cadena pesada del mismo, para realizar un enlace disulfuro entre la secuencia del péptido B2M y la secuencia de cadena pesada. En algunos casos, la secuencia de cadena pesada es un HLA y donde el enlace disulfuro se une a uno de los siguientes pares de residuos: primera posición del enlazador Gly 2, posición de la cadena pesada (HLA) Tyr 84; posición de la cadena ligera (B2M) Arg 12, HLA Ala236; y/o residuo B2M Arg12, residuo HLA Gly237.

En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio inhibidor. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio estimulador. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T es un anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo, un ligando peptídico, un péptido coestimulador de linfocitos T, una citocina o una toxina. En algunos casos, el dominio modulador de linfocitos T comprende un péptido PD-L1, el dominio variable de Ig de un péptido PD-L1, el dominio modulador de linfocitos T comprende 4-1BBL, el dominio modulador de linfocitos T comprende B7- 1 W88A, o el dominio modulador de linfocitos T comprende Fv monocatenario anti-CD28.

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos recombinantes descritos anteriormente, o en otra parte en el presente documento. La presente divulgación proporciona una célula transformada con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos recombinantes descritos anteriormente, o en otra parte en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un método para inhibir un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante de cualquiera de los descritos anteriormente, o en otra parte en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para inhibir un clon de linfocitos T.

La presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno autoinmune inhibiendo un clon de linfocitos T

autorreactivo que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante descrito anteriormente, o en otra parte en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para tratar un trastorno autoinmune.

La presente divulgación proporciona un método para estimular un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante descrito anteriormente, o en otra parte en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para estimular un clon de linfocitos T.

La presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer estimulando un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico en un cáncer que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante descrito anteriormente, o en otra parte en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

La presente divulgación proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a un péptido del dominio modulador de linfocitos T, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. La presente divulgación proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

La presente divulgación proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) un péptido del dominio modulador de linfocitos T contiguo a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. La presente divulgación proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

La presente divulgación proporciona polipéptidos multiméricos que comprenden al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); y donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig), donde el polipéptido multimérico comprende un dominio inmunomodulador en el extremo C-terminal del primer polipéptido o en el extremo N-terminal del segundo polipéptido. La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico. La presente divulgación proporciona vectores de expresión recombinante que comprenden los ácidos nucleicos. La presente divulgación proporciona células huésped genéticamente modificadas, donde las células huésped genéticamente modificadas están genéticamente modificadas con un ácido nucleico de la presente divulgación o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden los polipéptidos multiméricos. La presente divulgación proporciona métodos para modular una actividad de un linfocito T, implicando los métodos poner en contacto el linfocito T con un polipéptido multimérico de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento que implican administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona un recipiente que comprende un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; iii) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de Ig. La presente divulgación proporciona un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena pesada MHC de clase I. En algunos casos, el polipéptido de β 2-microglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un

85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I es una cadena pesada HLA-A, HLA-B, o HLA-C. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena alfa MHC de Clase II; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena beta MHC de Clase II. En algunos casos, el epítipo es un epítipo de linfocitos T. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1, un polipéptido Fc de IgG2, un polipéptido Fc de IgG3, un polipéptido Fc de IgG4, un polipéptido Fc de IgA, o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las figuras 24A-24C. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido se asocian de forma no covalente. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos covalentemente. En algunos casos, la unión covalente es a través de un enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido MHC o un enlazador entre el epítipo y el primer polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un primer residuo Cys, y el segundo polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, y donde el enlace disulfuro está entre el primer y el segundo residuos Cys. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende un primer enlazador interpuesto entre el epítipo y el primer polipéptido MHC. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL, y un polipéptido PD-L2. En algunos casos, el primer polipéptido o el segundo polipéptido comprende 2 o más péptidos inmunomoduladores. En algunos casos, los 2 o más péptidos inmunomoduladores están en tándem. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende un tercer polipéptido, donde el tercer polipéptido comprende un polipéptido inmunomodulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido inmunomodulador del primer polipéptido. En algunos casos, el tercer polipéptido está unido covalentemente al primer polipéptido. En algunos casos, donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) el segundo polipéptido MHC; ii) el polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig); y iii) una etiqueta de afinidad.

La presente divulgación proporciona un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) opcionalmente un polipéptido Fc de Ig o un andamiaje no Ig, donde el polipéptido multimérico comprende opcionalmente un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o un andamiaje no Ig, donde el polipéptido multimérico comprende uno o más dominios inmunoestimuladores, donde el uno o más dominios inmunoestimuladores es: A) en el extremo C-terminal del primer polipéptido; B) en el extremo N-terminal del segundo polipéptido; C) en el extremo C-terminal del segundo polipéptido; o D) en el extremo C-terminal del primer polipéptido y en el extremo N-terminal del segundo polipéptido. En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende un único polipéptido inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende dos polipéptidos inmunoestimuladores (por ejemplo, dos copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende tres polipéptidos inmunomoduladores (por ejemplo, tres copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende cuatro polipéptidos inmunomoduladores (por ejemplo, cuatro copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende un único polipéptido inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende dos polipéptidos inmunoestimuladores (por ejemplo, dos copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende tres polipéptidos inmunomoduladores (por ejemplo, tres copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende cuatro polipéptidos inmunomoduladores (por ejemplo, cuatro copias del mismo polipéptido inmunoestimulador). En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; iii) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; iii) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un dominio inmunomodulador. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un dominio inmunomodulador. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; y ii) un segundo polipéptido MHC. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer

polipéptido MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC. En algunos casos, el andamiaje no Ig es un polipéptido XTEN, un polipéptido de transferrina, un polipéptido del receptor Fc, un polipéptido de tipo elastina, un polipéptido de tipo seda, o un polipéptido de tipo seda-elastina. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena pesada MHC de clase I. En algunos casos, el polipéptido de β 2-microglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I es una cadena pesada de HLA-A, HLA-B, o HLA-C. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena alfa MHC de Clase II; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena beta MHC de Clase II. En algunos casos, el epítipo es un epítipo de linfocitos T. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende un polipéptido Fc, y donde el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1, un polipéptido Fc de IgG2, un polipéptido Fc de IgG3, un polipéptido Fc de IgG4, un polipéptido Fc de IgA, o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las figuras 24A-24C. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido se asocian de forma no covalente. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos covalentemente. En algunos casos, la unión covalente es a través de un enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido MHC o un enlazador entre el epítipo y el primer polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un primer residuo Cys, y el segundo polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, y donde el enlace disulfuro está entre el primer y el segundo residuos Cys. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende un primer enlazador interpuesto entre el epítipo y el primer polipéptido MHC. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL, y un polipéptido PD-L2. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende 2 o más péptidos inmunomoduladores. En algunos casos, los 2 o más péptidos inmunomoduladores están en tándem. En algunos casos, el polipéptido multimérico comprende un tercer polipéptido, donde el tercer polipéptido comprende un polipéptido inmunomodulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido inmunomodulador del primer polipéptido o el segundo polipéptido. En algunos casos, el tercer polipéptido está unido covalentemente al primer polipéptido. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) el segundo polipéptido MHC; ii) el polipéptido Fc de Ig; y iii) una etiqueta de afinidad.

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; en algunos casos, el ácido nucleico está presente en un vector de expresión recombinante. La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante, i) donde el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítipo; b) un primer polipéptido MHC; c) un polipéptido inmunomodulador; d) un enlazador proteolíticamente escindible o una señal de ausencia del ribosoma; e) un segundo polipéptido MHC; y f) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o un andamiaje no basado en Ig; o ii) donde el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítipo; b) un primer polipéptido MHC; c) un enlazador proteolíticamente escindible o una señal de ausencia del ribosoma; d) un polipéptido inmunomodulador; e) un segundo polipéptido MHC; y f) un polipéptido Fc de Ig o un andamiaje no basado en Ig. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido de β 2-microglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I es una cadena pesada de HLA-A, HLA-B, o HLA-C. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena alfa MHC de Clase II; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena beta MHC de Clase II. En algunos casos, el epítipo es un epítipo de linfocitos T. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1, un polipéptido Fc de IgG2, un polipéptido Fc de IgG3, un polipéptido Fc de IgG4, un polipéptido Fc de IgA, o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las figuras 24A-24C. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL, y un polipéptido PD-L2. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de un CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, beta receptora de linfotóxina, 3TR6, ILT3, ILT4, y HVEM. En algunos casos, el enlazador proteolíticamente escindible o señal de ausencia del ribosoma comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:37); b) ENLYTQS (SEQ ID NO:34); c) un sitio de escisión de furina; d) LVPR (SEQ ID NO:36); e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64); f) GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:65); g) GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:66);

y h) GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:67). En algunos casos, el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un primer péptido líder; b) el epítipo; c) el primer polipéptido MHC; d) el polipéptido inmunomodulador; e) el enlazador proteolíticamente escindible o señal de ausencia del ribosoma; f) un segundo péptido líder; g) el segundo polipéptido MHC; y h) el polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En algunos casos, el primer péptido líder y el segundo péptido líder es un péptido líder β 2-M. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un elemento de control transcripcional. En algunos casos, el elemento de control transcripcional es un promotor que es funcional en una célula eucariota. En algunos casos, el primer polipéptido MHC o un enlazador entre el epítipo y el primer polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un primer residuo Cys, y el segundo polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, y donde el primer y el segundo residuos Cys proporcionan un enlace disulfuro entre el primer polipéptido MHC y el segundo polipéptido MHC. La presente divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende uno cualquiera de los ácidos nucleicos descritos anteriormente o en otra parte en el presente documento. En algunos casos, el vector de expresión recombinante es un vector viral. En algunos casos, el vector de expresión recombinante es un vector no viral. La presente divulgación proporciona una célula huésped modificada genéticamente con un vector de expresión recombinante como se ha descrito anteriormente y en otra parte en el presente documento. En algunos casos, la célula huésped es *in vitro*. En algunos casos, la célula huésped está modificada genéticamente de tal forma que la célula no produzca un polipéptido de β 2-microglobulina MHC endógeno. En algunos casos, la célula huésped es un linfocito T.

La presente divulgación proporciona una composición que comprende: a) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de Ig o un andamiaje no basado en Ig. La presente divulgación proporciona una composición que comprende: a) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador ii) un segundo polipéptido MHC; y iii) un polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el primer y/o el segundo ácido nucleico está presente en un vector de expresión recombinante. La presente divulgación proporciona una célula huésped modificada genéticamente con una composición de ácido nucleico descrita anteriormente o en otra parte en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un método para producir un polipéptido multimérico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento, comprendiendo el método: a) cultivar una célula huésped como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento *in vitro* en un medio de cultivo en condiciones de tal forma que la célula huésped sintetice el polipéptido multimérico; y b) aislar el polipéptido multimérico de la célula huésped y/o del medio de cultivo. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende una etiqueta de afinidad, y donde dicho aislamiento comprende poner en contacto el polipéptido multimérico producido por la célula con un compañero de unión para la etiqueta de afinidad, donde el compañero de unión está inmovilizado, inmovilizando así el polipéptido multimérico. En algunos casos, el método comprende eluir el polipéptido multimérico inmovilizado.

La presente divulgación proporciona un método para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo, comprendiendo el método poner en contacto el linfocito T con un polipéptido multimérico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento, donde dicho contacto modula selectivamente la actividad del linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido activador, y donde el polipéptido multimérico activa el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido inhibidor, y donde el polipéptido multimérico inhibe el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el contacto se realiza *in vitro*. En algunos casos, el contacto se realiza *in vivo*.

La presente divulgación proporciona un método para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento eficaz para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo en un individuo. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido activador, y donde el polipéptido multimérico activa el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el epítipo es un epítipo asociado al cáncer, y donde dicha administración aumenta selectivamente la actividad de un linfocito T específico para el epítipo asociado al cáncer. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido inhibidor, y donde el polipéptido multimérico inhibe la actividad del linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el epítipo es un autoepítipo, y donde dicha administración inhibe selectivamente la actividad de un linfocito T específico para el autoepítipo.

La presente divulgación proporciona un método para tratar una infección en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de a) un polipéptido multimérico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento; o b) uno o más vectores de expresión recombinante que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico; o c) uno o más ARNm que comprenden secuencias de

nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el epítipo es un epítipo asociado a un patógeno, donde el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido activador, y donde dicha administración es eficaz para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo asociado a un patógeno en un individuo. En algunos casos, el patógeno es un virus, una bacteria, o un protozoo. En algunos casos, la administración es subcutánea (es decir, la administración se realiza a través de administración subcutánea). En algunos casos, la administración es intravenosa (es decir, la administración se realiza a través de administración intravenosa). En algunos casos, la administración es intramuscular (es decir, la administración se realiza a través de administración intramuscular). En algunos casos, la administración es sistémica. En algunos casos, la administración es distal a un sitio de tratamiento (es decir, la administración se realiza a través de administración subcutánea), la administración es local (es decir, la administración se realiza a través de administración subcutánea), la administración es en o cerca de un sitio de tratamiento.

La presente divulgación proporciona una composición que comprende: a) un polipéptido multimérico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento; y b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación proporciona una composición que comprende: a) un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento, o un vector de expresión recombinante como se ha descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento; y b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: SynTac: una sinapsis inmunológica artificial para la activación de linfocitos T. El panel de la izquierda muestra la hipótesis tradicional de dos señales para la activación de linfocitos T. Es decir, el acoplamiento de linfocitos T dirigido a través de interacciones de TCR único:epítipo MHC entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno (APC), seguido de estimulación o inhibición a través del compromiso de la molécula coestimuladora. El panel central es una representación esquemática de la molécula synTac seguida de un modo de acción para synTac (derecha). De forma análoga a la respuesta natural (izquierda), la proteína de fusión synTac permite un direccionamiento celular altamente específico a través del epítipo MHC. Después de esto, se encuentra un dominio modulador de linfocitos T ("MOD") que actúa a través del acoplamiento coestimulador de la molécula y puede proporcionar activación o inhibición. Esto provoca una respuesta de linfocitos T clonal y no global. En particular, el MOD puede ser cualquier anticuerpo conocido o aprobado, fragmento de anticuerpo, molécula coestimuladora u otra carga útil validada por la bibliografía (citocinas, toxinas, etc.), así como nuevas entradas.

Figuras 2A-2C: La construcción de fusión Fc synTac. Una estrategia explota una construcción de fusión Fc para aumentar la valencia, la estabilidad y la ventana terapéutica de los productos asociados. Brevemente, la región Fc es un homodímero covalente nativo, formado a través de la interacción de dos dominios CH2-CH3 de inmunoglobulina idénticos (denominados Fc) y estabilizado a través de dos enlaces disulfuro entre los dominios CH2, ilustrados como dos líneas finas. La figura 2A muestra una proteína MHC peptídica monocatenaria unida en su extremo carboxi a una región Fc de IgG. Para introducir enlaces proteicos alternativos (tal como un MOD), la construcción se dividió en cadenas pesadas y ligeras respectivas y fusionó tanto péptidos como proteínas a diversos extremos. Una construcción, la figura 2B, da como resultado una asociación amino-terminal del péptido con la cadena ligera (beta 2 microglobulina, B2M) seguida de una extensión carboxilo terminal de la cadena ligera a la molécula efectora MOD. En este escenario, la cadena pesada (molécula HLA, HC) se fusiona con la región Fc. Las construcciones se mantienen juntas covalentemente a través de puentes disulfuro (etiquetados como S-S). Una orientación alternativa, la figura 2C, coloca el extremo amino terminal MOD de la cadena pesada fusionada al Fc con el péptido aún unido a la cadena ligera de B2M.

Figuras 3A-3B: El diseño general de las dos moléculas synTac base. Esta construcción utiliza una secuencia líder de B2M humana nativa (LÍDER) para permitir la secreción eficiente y el procesamiento ER inmediatamente seguido de un epítipo candidato (etiquetado como PÉPTIDO). Para el enlace de cadena ligera (LC, figura 3A), esto se acopla a la molécula B2M nativa a través del enlazador L1 y al MOD a través del enlazador L2. Este casete en su totalidad está unido a otra secuencia líder de B2M, la cadena pesada MHC y un dominio Fc de IgG1 por un péptido de "autoescisión" de teschovirus-1 (P2A) porcino viral para permitir la expresión estequiométrica de cada cadena. El enlace de cadena pesada (HC, figura 3B) es similar, sin embargo, el péptido viral P2A ahora sigue al B2M y el MOD sigue al segundo péptido líder. Ambas construcciones terminan en una etiqueta 8x His.

Figura 4: Desactivación mediada por CRISPR/CAS de Beta-2-Microglobulina endógena. El ARN guía se diseñó contra B2M endógeno, se transfectó junto con un plásmido que codifica CRISPR/CAS y se dejó cultivar durante tres días. Las células cultivadas se tiñeron en la superficie para B2M y se contraseleccionaron (clasificadas por pérdida de fluorescencia) mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se permitió que las células clasificadas se recuperaran y se sometieran a dos rondas más de tinción, contraclasificación y recuperación (3 rondas en total) para garantizar una eliminación eficaz. Se comprobó la calidad del grupo final controlando la expresión superficial de B2M a través de FACS, como se ha mostrado anteriormente.

Figuras 5A-5B: Pruebas de producción y actividad de construcciones synTac con enlaces disulfuro diseñados. Se demostró una expresión de alto nivel para una construcción (H236-L12, marcada como synTac 18) con expresión modesta para una segunda (H237-L12, synTac 17). El esquema de disulfuro de dt-SCT se utiliza como control positivo (etiquetado como synTac 2). El PAGE no reductor sugiere que el resto de alto peso molecular, unido por disulfuro, se formó como se esperaba (figura 5A). Todas las construcciones de expresión se ampliaron a la escala de 100 ml, se purificaron y se probó la actividad a través de la unión de TCR afín expresado sobre la superficie de

las células HEK (denominadas A6), como se controló por fluorescencia FACS, lo que sugiere un plegamiento y actividad adecuados (figura 5B). Las células que expresan TCR no afines (denominadas AS01) se usaron como control negativo.

Figuras 6A-6B: Expresión de diversas fusiones de proteínas synTac. Expresión exitosa de (figura 6A) fusiones synTac unidas a una cadena ligera con diversos péptidos de direccionamiento e isotipos HLA con un dominio PD-L1 MOD, específicamente 1) HTLV-HLA-A02 humano, 2) IGRP-H2-Kd murino, y 3) TUM-H2-Kd murino, (figura 6B) fusión SynTac basada en IGRP que lleva diversos dominios MOD, 4) el dominio variable Ig de PD-L1, 5) 4-1BBL, 6) Fv monocatenario anti-CD28, y 7) B7-1W88A, (figura 6C) fusiones synTac basadas en IGRP expresadas como un enlace de cadena pesada, que llevan diversos MODS, 8) PD-L1 y 9) Fv monocatenario anti-CD28.

Figuras 7A-7B: Puenteo de TCR-synTac-PD1: Validación de la integridad de los componentes de proteína synTac. Las células HEK que expresan un TCR afín (A6) se usaron como control positivo y las células que expresaban un TCR no afín (AS01) se generaron y se usaron como control negativo junto con las células parentales no transducidas. Las células se expusieron a variantes synTac HTLV-PD-L1 purificadas no fluorescentes y se incubaron con su receptor afín PD1 fusionado a IgG2a murina. La fusión PD1-Fc se detectó usando un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC. Un esquema de la reacción se ilustra en la figura 7A, los resultados de FAC mostrados en la figura 7B. Como se esperaba, la fluorescencia colocalizada solo se observó cuando synTac presentado por HTLV CON un PD-L1 MOD se expuso a líneas celulares HEK afines (A6). Cabe destacar que esto no se observó cuando se expuso contra células HEK portadoras de TCR no afines o células parentales, cuando se expuso a FITC-PD1-Fc o cuando MOD estaba ausente.

Figuras 8A-8D: SynTac en acción: Ensayos de linfocitos T *in vitro*. Los linfocitos T CD8+ de 8.3 ratones NOD transgénicos eran cultivos en presencia de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado para estimular la activación de linfocitos T policlonales. Los cultivos estimulados se trataron con versiones solubles de synTac TUM-PD-L1 (figura 8A) o synTac IGRP-PD-L1 (figura 8C) para examinar la especificidad antigénica de cualquier efecto supresor. Una versión de synTac IGRP sin PD-L1 (figura 8B) sirvió como control efector para el dominio MOD. Antes de la siembra, las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) para controlar el grado de proliferación celular inducida por activación de linfocitos T. Las células se cosecharon a los 5 días y se examinaron usando citometría de flujo para determinar su viabilidad y proliferación. Los sobrenadantes también se examinaron para la expresión de las citocinas efectoras de linfocitos T CD8+ IFN γ y TNF α utilizando un ensayo de perlas citométricas de flujo multiplexado. Todos los parámetros de activación de linfocitos T CD8+ examinados se suprimieron de una manera específica del antígeno y dependiente del dominio efector (es decir, MOD) (figura 8D). Las figuras 9A-9F proporcionan secuencias de aminoácidos y una estructura de dominio de polipéptidos synTac. Las figuras 10A-10C representan construcciones para la *expresión trimérica de 4-1BBL*. Representación en dibujos (figura 10A) de la forma monomérica del ectodominio 4-1BBL nativo (residuos 50-254), que muestra los dominios de homología proximal de membrana (Memb Prox, MP) y TNF (TNF-H), (figura 10B) synTac dimérica 4-1BBL, y (figura 10C) forma trimérica dual totalmente activa de 4-1BBL synTac generada a través de la coexpresión de construcciones synTac tradicionales con una forma "libre" del ecto-dominio 4-1BBL (residuos 50-254, figura 10A) sin etiqueta de afinidad. Todas las construcciones se ensamblan cuando se expresan juntas en células de mamífero. La purificación se realiza a través de la región Fc (proteína A/G) seguida de exclusión por tamaño, lo que permite la separación de synTac trimérico 4-1BBL de BBL libre.

Figuras 11A-11B. Análisis de dispersión de luz multiángulo (MALS) de trímeros 4-1BBL con proteínas synTac. (figura 11A) Peso molecular de las principales especies identificadas a través de MALS, que muestran ejemplos de múltiples mediciones independientes. (figura 11B) Trazas representativas de MALS de synTac 40 + 51, con niveles relativamente altos de dispersión de luz y baja absorción de UV, lo que refleja la presencia de una pequeña cantidad de proteína con un alto peso molecular. Los componentes de tampón de bajo peso molecular dan como resultado grandes cambios en el índice de refracción (ya sea positivo o negativo) sin un cambio asociado en la absorbancia UV.

Figura 12. Unión del receptor SynTac 4-1BBL. Las microperlas de proteína A se recubrieron hasta la saturación con proteína de fusión 4-1BB-Fc humana o de ratón recombinante y se usaron para unir construcciones synTac que portan ligando 4-1BB (dímero y trímero) como el dominio comodulador, seguido de un anticuerpo de detección fluorescente específico para el isotipo de cadena pesada synTac. El grado de unión específica de synTac 4-1BBL a 4-1BB transmitido por perlas se midió entonces mediante citometría de flujo de alto rendimiento. Usando este sistema, se exploró el grado de reactividad cruzada y las afinidades relativas de 4-1BBL tanto para 4-1BB humano como murino en el contexto del andamiaje synTac. Se demostró que los synTacs portadores de 4-1BBL se unen al receptor afín, pero no a microperlas unidas a Fc "sin receptor" (denominado sin MOD), lo que sugiere un reactivo de proteína bien plegado y activo. En particular, el trímero se unió en un rango de afinidad esperado para el acoplamiento trimérico dual con el dímero original que muestra una reducción de 10 veces en la afinidad de unión y todas las construcciones reaccionan de forma cruzada entre los receptores murinos y humanos.

Figura 13. Los linfocitos T CD8+ de 8.3 ratones NOD transgénicos eran cultivos en presencia de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado para estimular la activación de linfocitos T policlonales. Los cultivos estimulados se trataron con versiones solubles de synTac TUM-41BBL (A) o synTac IGRP-41BBL (B y C) para examinar la especificidad antigénica de cualquier efecto estimulante. Los tratamientos de control fueron medio en solitario (- CNTRL) o anti-CD3 inmovilizado (+ CNTRL) para determinar la magnitud de la respuesta. Las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) para controlar el grado de proliferación celular inducida por activación de linfocitos T. Después de 4 días, las células se cosecharon y se examinaron usando citometría de flujo para determinar su viabilidad y proliferación. Los sobrenadantes también se examinaron para la expresión de las

citocinas efectoras de linfocitos T CD8⁺ IFN γ y TNF α utilizando un ensayo de perlas citométricas de flujo multiplexado. Todos los parámetros de activación de linfocitos T CD8⁺ examinados se activaron de una manera específica del antígeno y dependiente del dominio efector (es decir, MOD).

Figura 14. Ensayos de estimulación de linfocitos T *in vivo* de dosis única. Los ratones NOD fueron inyectados por vía intraperitoneal con synTac IGRP-41BBL, synTac TUM-41BBL o PBS. Seis días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se examinaron los esplenocitos mediante citometría de flujo para detectar frecuencias relativas de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP usando una tinción de pentámero de péptido-MHC apropiada. El tratamiento con IGRP-41BBL se asoció con una frecuencia mucho mayor de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP en comparación con los controles, lo que respalda una expansión significativa *in vivo* de una sola dosis.

Figura 15. Ensayos de estimulación de linfocitos T *in vivo* de dosis múltiple. Los ratones NOD se inyectaron por vía intraperitoneal con synTac IGRP-41BBL, synTac TUM-41BBL o PBS para tres dosis durante dos semanas. Siete días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y los PBMC (de sangre) se examinaron mediante citometría de flujo para detectar frecuencias relativas de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP usando una tinción de pentámero de péptido-MHC apropiada. El tratamiento con IGRP-41BBL se asoció con una frecuencia mayor de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP en comparación con los controles, lo que respalda una expansión significativa *in vivo* de dosis múltiples, incluyendo linfocitos T específicos de tumor raro (TUM).

Figuras 16A-16B. Esquemas de construcciones optimizadas para la expresión trimérica de 4-1BBL. Bloqueo de disulfuro (figura 16A, DL) y trímeros tricatenarios (figura 16B, SCT).

Figura 17. Unión del receptor SynTac 4-1BBL. Las microperlas de proteína A se recubrieron hasta la saturación con proteína de fusión 4-1BB-Fc humana o de ratón recombinante y se usaron para unir construcciones synTac que portan ligando 4-1BB (trímeros bloqueados por disulfuro (69, 70 y 71) y trímero monocatenario (SCT) como el dominio comodulador, seguido de un anticuerpo de detección fluorescente específico para el isotipo de cadena pesada synTac. El trímero nativo que se muestra es un control de unión (Trímero). El grado de unión específica de synTac 4-1BBL a 4-1BB transmitido por perlas se midió entonces mediante citometría de flujo de alto rendimiento. Se demostró que los synTacs portadores de 4-1BBL se unen al receptor afín, pero no a microperlas unidas a Fc "sin receptor" (denominado sin MOD), lo que sugiere un reactivo de proteína bien plegado y activo. Todas las construcciones reaccionan de forma cruzada entre receptores murinos y humanos.

Figura 18. Validación de la expresión de construcciones 4-1BBL optimizadas. SynTac's producido por coexpresión, con el modulador original 4-1BBL (synTac 40/51, sin bloqueo de disulfuro, etiquetado como "O" (para el original)) y tres construcciones optimizadas que contienen bloqueos de disulfuro diseñados que restringen la conformación del trímero. Se reemplazaron dos residuos nativos en cada construcción por residuos de cisteína (Q94C:P245C (etiquetado como "DL1" en gel), Q94C:P242C "DL2", y Q89C:L115C "DL3", denominado synTac 69, 70 y 71, respectivamente), coexpresados en células humanas con una versión "libre" no etiquetada que albergaba las mismas mutaciones (denominadas 98, 99, 100 respectivamente) para permitir el bloqueo covalente en la célula. El grado de enlace disulfuro se observó por la cantidad de 4-1BBL "libre" liberado (unido de forma no covalente) en el análisis de SDS PAGE no reducido. BBL libre migrará a ~20 kDa (BOX), confirmando el bloqueo de disulfuro de las construcciones diseñadas. SynTac que lleva una versión de trímero monocatenario (SCT) de 4-1BBL también se muestra después de la purificación por afinidad y filtración en gel (etiquetada como "SCT"). Masa precisa confirmada por dispersión de luz multiángulo (MALS).

Figuras 19A-19I. Representaciones esquemáticas de realizaciones de construcciones synTac de la presente divulgación. Las figuras 19A-19C representan construcciones descritas en relación con las figuras 2A-2C respectivamente; en la figura 19B y 19C, se representa el polipéptido sin escindir P2A (arriba) y se representa el polipéptido escindido (a través de la autoescisión mediada por P2A) (abajo) con enlace disulfuro (SS), mediado por sustitución de cisteína (*), ilustrado. Las figuras 19D-19F representan construcciones descritas anteriormente en relación con las figuras 8A-8C respectivamente; en cada una de las figuras 19D-19F, la forma no escindida de P2A se representa por encima (arriba) del polipéptido autoescindido mediado por P2A (abajo) con el enlace disulfuro (SS), mediado por sustitución de cisteína (*), ilustrado. La figura 19G representa una versión generalizada de la construcción synTac40 en relación con la figura 9B con los polipéptidos sin escindir (arriba) y autoescindidos/unidos por disulfuro (abajo) ilustrados. La figura 19H representa una versión generalizada de synTac69, synTac70 y synTac71 en relación con la figura 9C-9E, se ilustran los polipéptidos no escindidos (arriba) y autoescindidos/unidos por disulfuro (abajo) y también se indican sustituciones de cisteína adicionales en el dominio 4-1BBL (*). La figura 19I representa una versión generalizada del trímero monocatenario synTac 4-1BBL (SCT) en relación con la figura 9F, se ilustran los polipéptidos no escindidos (arriba) y autoescindidos/unidos por disulfuro (abajo).

La figura 20 proporciona un alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple de precursores de beta-2 microglobulina (B2M) (es decir, incluyendo la secuencia líder) de *Homo sapiens* (NP 004039.1; SEQ ID NO:78), *Pan troglodytes* (NP 001009066.1; SEQ ID NO:79), *Macaca mulatta* (NP 001040602.1; SEQ ID NO:80), *Bos Taurus* (NP 776318.1; SEQ ID NO:81) y *Mus musculus* (NP 033865.2; SEQ ID NO:82).

La figura 21 proporciona la estructura de dominio de la construcción de SEQ ID NO:6.

La figura 22 proporciona la estructura de dominio de la construcción de SEQ ID NO:7.

La figura 23 representa el efecto de la administración *in vivo* de synTac IGRP-PDL1, synTac TUM-PDL1, o una solución salina tamponada con fosfato (PBS) sobre la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP.

Las figuras 24A-24C proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos Fc de inmunoglobulina.

Las figuras 25A-25C proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos de cadena pesada de Clase I de antígeno leucocitario humano (HLA).

Las figuras 26A-26B proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos PD-L1.

La figura 27 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido 4-1BBL.
 La figura 28 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido ICOS-L.
 La figura 29 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido OX40L.
 La figura 30 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido PD-L2.
 La figura 31 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido CD80 (B7-1).
 La figura 32 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido CD86 (B7-2).
 La figura 33 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del ligando Fas (FAS-L).
 Las figuras 34A-34H proporcionan representaciones esquemáticas de realizaciones de construcciones synTac de la presente divulgación, donde se ilustra el enlace disulfuro (SS), mediado por la sustitución de cisteína (*). En estas realizaciones, se forman enlaces disulfuro entre polipéptidos MHC (por ejemplo, HLA) presentes en polipéptidos separados.

Definiciones

Una "secuencia líder" como se usa en el presente documento incluye cualquier péptido señal que pueda procesarse por una célula de mamífero, incluido el líder de B2M humano. Dichas secuencias se conocen bien en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "contiguo a" con respecto a, por ejemplo, el elemento A y el elemento B, significa que el elemento A es adyacente al elemento B y está unido al elemento B, preferiblemente, a menos que se especifique de otro modo, a través de un enlace covalente. Por ejemplo, para una primera secuencia de aminoácidos contigua a una segunda secuencia de aminoácidos, el extremo C-terminal de la primera secuencia de aminoácidos se puede unir mediante un enlace peptídico al extremo N-terminal de la segunda secuencia de aminoácidos.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, modificados química o bioquímicamente o aminoácidos derivatizados, y polipéptidos que tienen esqueletos de péptidos modificados. Los términos también incluyen polipéptidos que tienen cotraducción (por ejemplo, escisión del péptido señal) y modificaciones postraduccionales del polipéptido, tales como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, acetilación, fosforilación, escisión proteolítica y similares. Además, como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora como se conocerá por una persona en la técnica) con respecto a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis de sitio dirigido, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas, o errores debidos a la amplificación por PCR u otros métodos de ADN recombinante.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético y/o sintético, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con ninguna o una parte de las secuencias de polinucleótidos con las que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido, se refiere a un polipéptido producido por expresión a partir de un polinucleótido recombinante. El término "recombinante", como se usa con respecto a una célula huésped o un virus, se refiere a una célula huésped o virus en el que se ha introducido un polinucleótido recombinante. Recombinante también se usa en el presente documento para referirse, con referencia al material (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector) a que el material ha sido modificado por la introducción de un material heterólogo (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector).

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento para incluir una forma polimérica de nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término se refiere solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, los términos incluyen ADN tricatenario, bicatenario y monocatenario, así como ARN tricatenario, bicatenario y monocatenario. Los términos también incluyen dichas moléculas con modificaciones, tales como por metilación y/o por protección terminal, y formas no modificadas de un polinucleótido. Más particularmente, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" incluyen polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), cualquier otro tipo de polinucleótido que es un N- o C-glucósido de una base de purina o pirimidina, y otros polímeros que contienen esqueletos no nucleotídicos, polímeros y otros polímeros de ácido nucleico específicos de secuencia sintética, con la condición de que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el emparejamiento de bases y apilamiento de bases, como el que se encuentra en el ADN y el ARN.

El término "vector" como se usa en el presente documento se refiere a un vehículo capaz de transferir secuencias de ácido nucleico a células diana. Por ejemplo, un vector puede comprender una secuencia codificante capaz de expresarse en una célula diana. Como se usa en el presente documento, "construcción de vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia génica" generalmente se refieren a cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que es útil para transferir el gen de interés a las células diana. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores integradores y vectores no

integradores. Por lo tanto, los vectores son capaces de transferir secuencias de ácido nucleico a células diana y, en algunos casos, se usan para manipular secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico recombinantes (es decir, para hacer secuencias de ácido nucleico recombinantes) y similares. Para los propósitos de esta divulgación, los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagos, transposones, cósmidos, virus y similares.

Un "casete de expresión", como se usa en el presente documento, comprende cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de cualquier transcrito de ARN, incluida la secuencia génica/codificante de interés, así como los ARN no traducidos. Dichos casetes pueden construirse en un "vector", "construcción de vector", "vector de expresión" o "vector de transferencia génica", para transferir el casete de expresión a las células diana. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. Un transcrito de un casete de expresión puede expresarse de manera estable o transitoria y puede expresarse desde un casete que se integra en el genoma del huésped (de manera dirigida o no dirigida) o puede permanecer no integrado según se desee.

"Unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a su transcripción o expresión. Como se usa en el presente documento, los términos promotores heterólogo y regiones de control heterólogas se refieren a promotores y otras regiones de control que normalmente no están asociadas con un ácido nucleico particular en la naturaleza. Por ejemplo, una "región de control de la transcripción heteróloga a una región codificante" es una región de control de la transcripción que normalmente no está asociada con la región codificante en la naturaleza.

El término "sinapsis inmunológica" o "sinapsis inmune", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a la interfaz natural entre dos células inmunes de interacción de una respuesta inmune adaptativa que incluye, por ejemplo, la interfaz entre una célula presentadora de antígeno (APC) o diana célula y una célula efectora, por ejemplo, un linfocito, un linfocito T efector, una célula asesina natural, y similares. Una sinapsis inmunológica entre un APC y un linfocito T generalmente se inicia por la interacción de un receptor de antígeno de linfocitos T y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, por ejemplo, como se describe en Bromley et al., *Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-96;

Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" usado en referencia a secuencias de ácido nucleico, proteínas o polipéptidos, significa que estas moléculas no se producen de forma natural en la célula de la que se deriva la secuencia de ácido nucleico heteróloga, proteína o polipéptido. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido humano que se inserta en una célula que no es una célula humana es una secuencia de ácido nucleico heterólogo en ese contexto particular. Mientras que los ácidos nucleicos heterólogos pueden derivarse de diferentes organismos o especies animales, dicho ácido nucleico no necesita derivarse de especies de organismos separados para ser heterólogo. Por ejemplo, en algunos casos, una secuencia de ácido nucleico sintético o un polipéptido codificado a partir de la misma puede ser heterólogo a una célula en la que se introduce, ya que la célula no contenía previamente el ácido nucleico sintético. Como tal, una secuencia de ácido nucleico sintética o un polipéptido codificado a partir de la misma, puede considerarse heteróloga a una célula humana, por ejemplo, incluso si uno o más componentes de la secuencia de ácido nucleico sintético o un polipéptido codificado a partir de la misma se derivaron originalmente de una célula humana.

Una "célula huésped", como se usa en el presente documento, representa una célula eucariota *in vivo* o *in vitro* o una célula de un organismo multicelular (por ejemplo, una línea celular) cultivada como una entidad unicelular, cuyas células eucariotas pueden utilizarse, o haberse utilizado como receptores de un ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido multimérico de la presente divulgación), e incluyen la progenie de la célula original que se ha modificado genéticamente por el ácido nucleico. Se entiende que la progenie de una sola célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento del ADN genómico o total como el precursor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una "célula huésped recombinante" (también denominada "célula huésped genéticamente modificada") es una célula huésped en la que se ha introducido un ácido nucleico heterólogo, por ejemplo, un vector de expresión. Por ejemplo, una célula huésped eucariota modificada genéticamente se modifica genéticamente en virtud de la introducción en una célula huésped eucariota adecuada de un ácido nucleico heterólogo, por ejemplo, un ácido nucleico exógeno que es externo a la célula huésped eucariota, o un ácido nucleico recombinante que no se encuentra normalmente en la célula huésped eucariota.

En algunos casos, se hace referencia a las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, incluyendo polipéptidos y ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos, basándose en "similitud de secuencia" o "identidad de secuencia", por ejemplo, en comparación con una o más secuencias de referencia. En otros casos, se puede hacer referencia a una secuencia mutante o variante basándose en la comparación con una o más secuencias de referencia. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo

en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

Cuando sea necesario o deseado, el alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-53 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988), mediante implementaciones por ordenador de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual. (Véase, generalmente Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1999)).

El "linfocito T" incluye todos los tipos de células inmunes que expresan CD3, incluyendo los linfocitos T auxiliares (células CD4⁺), los linfocitos T citotóxicos (células CD8⁺), los linfocitos T reguladores (Treg) y las células NK-T.

El "ligando coestimulador", como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una APC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptido, media una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando Fas (FasL), ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, beta receptor de linfotóxina, 3TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83.

Los términos "purificar", "aislar", y similares, se refieren a la eliminación de una sustancia deseada, por ejemplo, una proteína recombinante, de una solución que contiene sustancias no deseadas, por ejemplo, contaminantes, o la eliminación de sustancias no deseadas de una solución que contiene las sustancias deseadas, dejando esencialmente solo la sustancia deseada. En algunos casos, una sustancia purificada puede estar esencialmente libre de otras sustancias, por ejemplo, contaminantes. La purificación, como se usa en el presente documento, puede referirse a un intervalo de diferentes purezas resultantes, por ejemplo, donde la sustancia purificada constituye hasta más del 80 % de toda la sustancia en la solución, incluyendo más del 85 %, más del 90 %, más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 %, más del 99,5 %, más del 99,9 %, y similares. Como se entenderá por los expertos en la técnica, generalmente, los componentes de la propia solución, por ejemplo, agua o tampón, o sales no se consideran al determinar la pureza de una sustancia.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" como se usa en el presente documento, incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar una regresión de la enfermedad.

Los términos "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, murinos (por ejemplo, ratas, ratones), lagomorfos (por ejemplo, conejos), primates no humanos, seres humanos, caninos, felinos, ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, ovinos, porcinos, caprinos), etc.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un agente, o cantidades combinadas de dos agentes, que, cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para realizar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará según el agente o agentes, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Antes de que la presente invención se describa adicionalmente, debe entenderse que esta invención no está limitada a realizaciones particulares descritas, sino que se define por las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese

intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se abarcan dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido multimérico" incluye una pluralidad de dichos polipéptidos y la referencia al "polipéptido inmunomodulador" incluye la referencia a uno o más polipéptidos inmunomoduladores y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la mención de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a la invención se abarcan específicamente por la presente invención y se divulgan en el presente documento como si todas y cada una de las combinaciones se revelaran individual y explícitamente. Además, todas las subcombinaciones de las diversas realizaciones y elementos de las mismas también están incluidas específicamente por la presente invención y se divulgan en el presente documento como si cada una de estas subcombinaciones se revelara individual y explícitamente en el presente documento.

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, lo que podría necesitar ser confirmado de manera independiente.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe una nueva plataforma terapéutica a base de proteínas que recapitula una respuesta inmune tradicional; una sinapsis inmunológica artificial para la activación de linfocitos T (synTac). Una nueva proteína de fusión que une una molécula coestimuladora a un epítipo MHC para permitir el acoplamiento preciso de los linfocitos T y la activación o inhibición clonal de los linfocitos T, dependiendo de la porción de la molécula MOD.

POLIPÉPTIDOS MULTIMÉRICOS

La presente divulgación proporciona polipéptidos multiméricos (por ejemplo, heterodiméricos, heterotriméricos). La presente divulgación proporciona precursores de poliproteínas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona productos génicos precursores, por ejemplo, precursores de poliproteínas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, y productos génicos de ARNm que codifican dos o más cadenas polipeptídicas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

También se proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a un péptido del dominio modulador de linfocitos T, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. En una realización, la construcción polipeptídica recombinante comprende

LLFGYPVYVGC GGSGGGSGGGSGGGSGIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGF
HPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDMGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERE
LDLLALV VYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQH SNFRGRASLPKDQLLK GNAALQITDVKL
QDAGVYCCII SYGGADYKRITLKV N APYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWT
NSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELI IPE
LPATHPPQNRTSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMSRSVALAVLALLSLSGLEAGSHSM
RYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRM EPRAPWIEQEGPEYWDGET
RKVK AHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDG

KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKE
TLQR TDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRP
AGDGT FQKWA AVV VPSGQE QRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPA AAGDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSHHHHHHHH (SEQ ID
NO:6).

- 5 También se proporciona una construcción de polipéptido recombinante que comprende (i) un péptido de epítipo candidato unido por una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana, donde (i) está unida por un, o más de un, enlace disulfuro a (ii) un péptido del dominio modulador de linfocitos T contiguo a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de una cadena pesada MHC contigua a una tercera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos
10 idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina. En una realización, la construcción polipeptídica recombinante comprende

LLFGYPVYVGGCGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGF
HPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDMGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMSRSV
ALAVLALLSLSGLEAFTITAPKDL YVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALV VYWEKEDE
QVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCII SYGGA
DYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQP VSGKRSVTT
SRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQ
RMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVK AHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRM YG
CDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKD YIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQL
RAYLEGTCVEWLRRLRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYPAEIT
LTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQE QRYTCHVQHEGLPKPLTL
RWEPA AAGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GGSHHHHHHHHH (SEO ID NO:7).

5 También se proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes descritas en el presente documento unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

10 También se proporciona una proteína que comprende dos de las construcciones polipeptídicas recombinantes descritas en el presente documento unidas por uno o más enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina respectivos de los mismos.

Esta invención proporciona una plataforma synTac: una sinapsis inmunológica artificial para la activación de linfocitos T dirigida como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 En una realización, la beta 2 microglobulina tiene la misma secuencia que una beta 2 microglobulina humana. En una
realización, la secuencia de cadena pesada del complejo de histocompatibilidad tiene la misma secuencia que una
secuencia de HLA-A humana. En una realización, el dominio transmembrana de cadena pesada del complejo de
histocompatibilidad tiene la misma secuencia que un dominio transmembrana de cadena pesada del complejo mayor
de histocompatibilidad I (MHC I) humano. En una realización, el dominio transmembrana de cadena pesada del
20 complejo de histocompatibilidad tiene la misma secuencia que un dominio transmembrana de cadena pesada del
complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) humano.

También se proporciona una composición que comprende una pluralidad de las construcciones.

25 En una realización, el epítipo peptídico candidato es un péptido de 8, 9, 10, 11 o 12 aminoácidos. En una realización, el epítipo peptídico candidato es un péptido de 13, 14, 15, 16, o 17 aminoácidos. En una realización, el epítipo peptídico candidato es un nonúmero (9 aminoácidos de longitud).

La presente divulgación proporciona polipéptidos multiméricos que comprenden dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o más) cadenas polipeptídicas. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden

del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) opcionalmente un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o un andamiaje no Ig, donde el polipéptido multimérico comprende uno o más dominios inmunoestimuladores, donde el uno o más dominios inmunomoduladores son: A) en el extremo C-terminal del primer polipéptido; B) en el extremo N-terminal del segundo polipéptido; C) en el extremo C-terminal del segundo polipéptido; o D) en el extremo C-terminal del primer polipéptido y en el extremo N-terminal del segundo polipéptido.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo amino (extremo N-terminal) al extremo carboxilo (extremo C-terminal): a) un epítipo (por ejemplo, un epítipo de linfocitos T); b) un primer polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y c) un polipéptido inmunomodulador; y donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un segundo polipéptido MHC; y b) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En otros casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítipo (por ejemplo, un epítipo de linfocitos T); y b) un primer polipéptido MHC; y donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un polipéptido inmunomodulador; b) un segundo polipéptido MHC; y c) un polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el primer y el segundo polipéptidos MHC son polipéptidos MHC de Clase I; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina (B2M) MHC de Clase I, y el segundo polipéptido MHC es una cadena pesada (cadena H) MHC de Clase I. En otros casos, el primer y el segundo polipéptidos MHC son polipéptidos MHC de Clase II; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena α MHC de Clase II, y el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena β MHC de Clase II. En otros casos, el primer polipéptido es un polipéptido de cadena β MHC de Clase II, y el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena α MHC de Clase II. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores. Cuando un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores, en algunos casos, los dos o más polipéptidos inmunomoduladores están presentes en la misma cadena polipeptídica, y puede estar en tándem. Cuando polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores, en algunos casos, los dos o más polipéptidos inmunomoduladores están presentes en polipéptidos separados. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un heterodímero. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido trimérico.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un polipéptido Fc de Ig; y iii) un dominio inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC; y ii) un dominio inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; y ii) un primer polipéptido MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; y ii) un segundo polipéptido MHC. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo; ii) un primer polipéptido MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido MHC. En algunos casos, cuando un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende un andamiaje no Ig, el andamiaje no Ig es un péptido XTEN, un polipéptido de transferrina, un polipéptido del receptor Fc, un polipéptido de tipo elastina, un polipéptido de tipo seda, o un polipéptido de tipo seda-elastina.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación es monovalente. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación es multivalente. Por ejemplo, dependiendo del polipéptido Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación, el polipéptido multimérico puede ser un homodímero, donde dos moléculas del polipéptido multimérico están presentes en el homodímero, donde las dos moléculas del polipéptido multimérico pueden estar unidas por disulfuro entre sí, por ejemplo, a través del polipéptido Fc presente en las dos moléculas. Como otro ejemplo, un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender tres, cuatro o cinco moléculas del polipéptido multimérico, donde las moléculas del polipéptido multimérico pueden estar unidas por disulfuro entre sí, por ejemplo, a través del polipéptido Fc presente en las moléculas.

Enlazadores

Un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede incluir péptidos enlazadores interpuestos entre, por ejemplo, un epítipo y un polipéptido MHC, entre un polipéptido MHC y un polipéptido inmunomodulador, o entre un polipéptido MHC y un polipéptido Fc de Ig.

Los enlazadores adecuados (también denominados "espaciadores") pueden seleccionarse fácilmente y pueden tener cualquiera de varias longitudes adecuadas, tal como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos,

de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y puede tener 1,2, 3, 4, 5, 6, o 7 aminoácidos.

Los enlazadores a modo de ejemplo incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO:8) y (GGGS)_n (SEQ ID NO:9), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Se pueden usar polímeros de glicina y glicina-serina; tanto Gly como Ser están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como una conexión neutra entre los componentes. Se pueden usar polímeros de glicina; la glicina accede significativamente a más espacio phi-psi que incluso la alanina, y es mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (véase Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173- 142 (1992)). Los enlazadores a modo de ejemplo pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, GGSG (SEQ ID NO: 10), GSGGG (SEQ ID NO: 11), GSGSG (SEQ ID NO: 12), GSGGG (SEQ ID NO: 13), GGGSG (SEQ ID NO: 14), GSSSG (SEQ ID NO: 15), y similares.

En algunos casos, un polipéptido enlazador, presente en un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, incluye un residuo de cisteína que puede formar un enlace disulfuro con un residuo de cisteína presente en un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, por ejemplo, un enlazador adecuado comprende la secuencia de aminoácidos GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16).

Epítomos

Un epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede tener una longitud de aproximadamente 4 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo, el epítopo puede tener una longitud de 4 aminoácidos (aa) a 10 aa, de 10 aa a 15 aa, de 15 aa a 20 aa, o de 20 aa a 25 aa. Por ejemplo, un epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede tener una longitud de 4 aminoácidos (aa), 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, 10 aa, 11 aa, 12 aa, 13 aa, 14 aa, 15 aa, 16 aa, 17 aa, 18 aa, 19 aa, 20 aa, 21 aa, 22 aa, 23 aa, 24 aa, o 25 aa. En algunos casos, un epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación tiene una longitud de 5 aminoácidos a 10 aminoácidos, por ejemplo, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, o 10 aa.

Un epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación está unido específicamente por un linfocito T, es decir, el epítopo está unido específicamente por un linfocito T específico de epítopo. Un linfocito T específico de epítopo se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos de referencia, pero no se une sustancialmente a un epítopo que difiere de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, un linfocito T específico de epítopo se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos de referencia, y se une a un epítopo que difiere de la secuencia de aminoácidos de referencia, en todo caso, con una afinidad menor de 10⁻⁶ M, menos de 10⁻⁵ M, o menos de 10⁻⁴ M. Un linfocito T específico de epítopo puede unirse a un epítopo para el cual es específico con una afinidad de al menos 10⁻⁷ M, al menos 10⁻⁸ M, al menos 10⁻⁹ M, o al menos 10⁻¹⁰ M.

Los ejemplos no limitantes de epítomos incluyen, por ejemplo, el epítopo del virus 1 linfotrófico T humano LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 17); el epítopo tumoral KYQAVTTTL (SEQ ID NO: 18); y el epítopo (IGRP) de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote VYLKTNVFL (SEQ ID NO: 19) o TYLKTNLFL (SEQ ID NO:20). Yang et al. (2006) *J. Immunol.* 176:2781.

Polipéptidos MHC

Como se ha apreciado anteriormente, un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye polipéptidos MHC. Para los fines de la presente divulgación, el término "polipéptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)" incluye polipéptidos MHC de diversas especies, incluidos los polipéptidos MHC humanos (también conocidos como antígeno leucocitario humano (HLA)), polipéptidos MHC de roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), y polipéptidos MHC de otras especies de mamíferos (por ejemplo, lagomorfos, primates no humanos, caninos, felinos, ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, etc.), y similares. El término "polipéptido MHC" pretende incluir polipéptidos MHC de Clase I (por ejemplo, β-2 microglobulina y cadena pesada MHC de Clase I) y polipéptidos MHC de Clase II (por ejemplo, polipéptido α MHC de Clase II y polipéptido β MHC de Clase II).

Como se ha apreciado anteriormente, en algunas realizaciones de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, el primer y el segundo polipéptidos MHC son polipéptidos MHC de Clase I; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β2-microglobulina (B2M) MHC de Clase I, y el segundo polipéptido MHC es una cadena pesada (cadena H) MHC de Clase I. En otros casos, el primer y el segundo polipéptidos MHC son polipéptidos MHC de Clase II; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena α MHC de Clase II, y el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena β MHC de Clase II. En otros casos, el primer polipéptido es un polipéptido de cadena β MHC de Clase II, y el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena α MHC de Clase II.

En algunos casos, un polipéptido MHC de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido MHC humano, donde los polipéptidos MHC humanos también se denominan polipéptidos "de antígeno leucocitario humano" ("HLA"). En algunos casos, un polipéptido MHC de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un

polipéptido HLA de Clase I, por ejemplo, un polipéptido β 2-microglobulina, o un polipéptido de cadena pesada HLA de Clase I. Los polipéptidos de cadena pesada HLA de Clase I incluyen polipéptidos de cadena pesada HLA-A, polipéptidos de cadena pesada HLA-B, polipéptidos de cadena pesada HLA-C, polipéptidos de cadena pesada HLA-E, polipéptidos de cadena pesada HLA-F, y polipéptidos de cadena pesada HLA-G. En algunos casos, un polipéptido MHC de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido HLA de Clase II, por ejemplo, una cadena α HLA de Clase II o una cadena β HLA de Clase II. Los polipéptidos MHC de Clase II incluyen polipéptidos DP α y β MCH de Clase II, polipéptidos DM α y β , polipéptidos DOA α y β , polipéptidos DOB α y β , polipéptidos DQ α y β , y polipéptidos DR α y β .

Como un ejemplo, un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 25-365 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada HLA-A humana representado en la figura 25A.

Como un ejemplo, un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 25-365 de la secuencia de aminoácidos de la siguiente secuencia de aminoácidos de cadena pesada HLA-A humana:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQRM EPRAPWIEQEGPEY
WDGETR KVK AHSQTHRVDLGLRGYYNQSEAGSHTVQRM YGCDVGS DWRF LRGYHQ
YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQT T KHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEW LRRY
LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYP AEITLTWQRDGEDQTQDTE
LVETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:5).

Como otro ejemplo, un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 25-362 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada HLA-B humana representado en la figura 25B.

Como otro ejemplo, un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 25-362 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada HLA-C humana representado en la figura 25C.

Como otro ejemplo, un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

GP HSLRYFVTAVSRPGLGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDS DADNPRFEPRAPWMEQ
EGPEY WEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGS DWRLLR
GYQQFAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYYRAYLEGE CVEWL
RRYLELGNETLLRTDSPKAHV TYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQD
MELVETRPAGDGT FQKWA AVVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRW (SEQ ID NO:22).

Un polipéptido de β 2-microglobulina (B2M) de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede ser un polipéptido B2M humano, un polipéptido B2M de primate no humano, un polipéptido B2M murino, y similares. En algunos casos, un polipéptido B2M comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos B2M representada en la figura 20.

En algunos casos, un polipéptido MHC comprende una única sustitución de aminoácidos con respecto a un polipéptido MHC de referencia (donde un polipéptido MHC de referencia puede ser un polipéptido MHC de tipo silvestre), donde la sustitución de un solo aminoácido sustituye un aminoácido con un residuo de cisteína (Cys). Dichos residuos de cisteína, cuando están presentes en un polipéptido MHC de un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, pueden formar un enlace disulfuro con un residuo de cisteína presente en una segunda cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

En algunos casos, un primer polipéptido MHC en un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, y/o el segundo polipéptido MHC en el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, incluye una sustitución de aminoácidos para sustituir un aminoácido con una cisteína, donde la cisteína sustituida en el primer polipéptido MHC forma un enlace disulfuro con una cisteína en el segundo polipéptido MHC, donde una cisteína en el primer polipéptido MHC forma un enlace disulfuro con la cisteína sustituida en el segundo polipéptido MHC, o donde la cisteína sustituida en el primer polipéptido MHC forma un enlace disulfuro con la cisteína sustituida en el segundo polipéptido MHC.

Por ejemplo, en algunos casos, uno de los siguientes pares de residuos en una β 2-microglobulina de HLA y una cadena pesada de HLA de Clase I se sustituye con cisteínas: 1) residuo B2M 12, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 236; 2) residuo B2M 12, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 237; 3) residuo B2M 8, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 234; 4) residuo B2M 10, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 235; 5) residuo B2M 24, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 236; 6) residuo B2M 28, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 232; 7) residuo B2M 98, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 192; 8) residuo B2M 99, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 234; 9) residuo B2M 3, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 120; 10) residuo B2M 31, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 96; 11) residuo B2M 53, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 35; 12) residuo B2M 60, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 96; 13) residuo B2M 60, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 122; 14) residuo B2M 63, residuo de cadena pesada HLA de Clase I 27; 15) residuo B2M Arg3, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Gly120; 16) residuo B2M His31, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Gln96; 17) residuo B2M Asp53, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Arg35; 18) residuo B2M Trp60, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Gln96; 19) residuo B2M Trp60, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Asp 122; 20) residuo B2M Tyr63, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Tyr27; 21) residuo B2M Lys6, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Glu232; 22) residuo B2M Gln8, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Arg234; 23) residuo B2M Tyr10, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Pro235; 24) residuo B2M Ser11, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Gln242; 25) residuo B2M Asn24, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Ala236; 26) residuo B2M Ser28, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Glu232; 27) residuo B2M Asp98, residuo de cadena pesada HLA de Clase I His 192; y 28) residuo B2M Met99, residuo de cadena pesada HLA de Clase I Arg234. La numeración de aminoácidos de la cadena pesada MHC/HLA de Clase I es en referencia a la cadena pesada MHC/HLA de Clase I madura, sin un péptido señal. Por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos representada en la figura 25A, que incluye un péptido señal, Gly120 es Gly144; Gln96 es Gln120; etc.

Polipéptidos inmunomoduladores

Un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede ser un polipéptido inmunomodulador activador o un polipéptido inmunomodulador inhibidor. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye un único polipéptido inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye dos polipéptidos inmunomoduladores. En algunos casos, los dos polipéptidos inmunomoduladores están en tándem en una cadena polipeptídica. En algunos casos, los dos polipéptidos inmunomoduladores están en cadenas polipeptídicas separadas. En algunos casos, los dos polipéptidos inmunomoduladores están en cadenas polipeptídicas separadas y están unidos por disulfuro entre sí.

Un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es, en algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T. En algunos casos, el polipéptido modulador de linfocitos T es un polipéptido modulador de linfocitos T estimulador (de activación). En algunos casos, el polipéptido modulador de linfocitos T es un polipéptido modulador de linfocitos T inhibidor. Un polipéptido modulador de linfocitos T puede ser un anticuerpo, un ligando peptídico, un polipéptido coestimulador de linfocitos T, una citocina, o una toxina.

En algunos casos, un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un resto de reconocimiento basado en anticuerpos o no basado en anticuerpos que se une específicamente a un polipéptido coestimulador que se expresa sobre la superficie de un linfocito T específico de epítipo. Los restos de reconocimiento basados en anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos; fragmentos de anticuerpos que conservan la unión específica al antígeno, incluyendo, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fv, Fv monocatenario (scFv) y Fd; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos monocatenarios (scAb), anticuerpos de dominio único (dAb); anticuerpos de cadena pesada de dominio único; anticuerpos de cadena ligera de dominio único; y similares. Los restos de reconocimiento no basados en anticuerpos adecuados incluyen, por ejemplo, afímeros; dominios de Kunitz modificados; monocuerpos (adnectinas); anticalinas; aptámeros; dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPs); un sitio de unión de un polipéptido rico en cisteína (por ejemplo, péptidos de tipo knottin ricos en cisteína); avímeros; aflinas; y similares. Un resto de reconocimiento basado en anticuerpos o no basado en anticuerpos se une

específicamente a un polipéptido coestimulador que se expresa en la superficie de un linfocito T específico de epítipo, donde dichos polipéptidos coestimuladores incluyen, pero sin limitación, CTLA4, PD1, ICOS, OX40, CD20, y 4-1BB. Los polipéptidos coestimuladores que se expresan en la superficie de un linfocito T específico de epítipo se conocen en la técnica.

5 En algunos casos, un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido coestimulador de linfocitos T. En algunos casos, un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido coestimulador de linfocitos T y es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF); por ejemplo, un polipéptido FasL, un polipéptido 41BBL, un
10 polipéptido CD40, un polipéptido OX40L, un polipéptido CD30L, un polipéptido CD70, etc. En algunos casos, un polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido coestimulador de linfocitos T y es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig); por ejemplo, un polipéptido CD7, un polipéptido CD86, un polipéptido ICAM, etc.

15 Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, PD-L1, FasL, y PD-L2. Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, beta receptora de linfotóxina, 3TR6, ILT3, ILT4, y HVEM.

20 En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido PD-L1. En algunos casos, un polipéptido PD-L1 de un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de
25 aminoácidos con los aminoácidos 19-290 de una secuencia de aminoácidos PD-L1 representada en la figura 26A o 26B.

En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido 4-1BBL. En algunos casos, un polipéptido 4-1BBL de un polipéptido multimérico de la presente
30 divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 50-254 de la secuencia de aminoácidos 4-1BBL representada en la figura 27.

35 En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido ICOS-L. En algunos casos, un polipéptido ICOS-L de un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de
40 secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 19-302 de la secuencia de aminoácidos ICOS-L representada en la figura 28.

En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido OX40L. En algunos casos, un polipéptido OX40L de un polipéptido multimérico de la presente
45 divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1-183 de la secuencia de aminoácidos OX40L representada en la figura 29.

50 En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido PD-L2. En algunos casos, un polipéptido PD-L2 de un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de
aminoácidos con los aminoácidos 20-273 de la secuencia de aminoácidos PD-L2 representada en la figura 30.

55 En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido CD80 (B7-1). En algunos casos, un polipéptido CD80 de un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de
60 secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 35-288 de la secuencia de aminoácidos CD80 representada en la figura 31.

En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido CD86. En algunos casos, un polipéptido CD86 de un polipéptido multimérico de la presente divulgación
65 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 31-329 de la secuencia de aminoácidos CD86 representada en la figura 32.

En algunos casos, un polipéptido modulador de linfocitos T de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es un polipéptido FasL. En algunos casos, un polipéptido FasL de un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1-281 de la secuencia de aminoácidos FasL representada en la figura 33.

Los dominios moduladores de linfocitos T (MOD) adicionales que se pueden emplear en la invención incluyen productos génicos humanos (proteínas) de origen natural o sintéticos, reactivos de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv monocatenarios, aptámeros, nanocuerpo) dirigidos a un producto génico humano, incluyendo, pero sin limitación, todas las proteínas secretadas que surgen de los mecanismos de secreción habituales y no habituales (por ejemplo, FGF2, IL1, S100A4), y ectodominios de todas las proteínas de superficie celular ancladas por segmentos de proteínas genéticamente codificados de origen natural (tramos de membrana simples o múltiples) o modificaciones postraduccionales tales como enlaces GPI). Cualquier reactivo de afinidad de origen natural o sintético (por ejemplo, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv monocatenarios, aptámero, nanocuerpo, lectina, etc.) dirigido a un glicano de superficie celular u otra modificación postraducciona (por ejemplo, sulfatación). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, miembros de la familia TNF/TNFR (OX40L, ICOSL, FASL, LTA, LTB TRAIL, CD 153, TNFSF9, RANKL, TWEAK, TNFSF13, TNFSF13b, TNFSF14, TNFSF15, TNFSF18, CD40LG, CD70) o reactivos de afinidad dirigidos a los miembros de la familia TNF/TNFR; miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (VISTA, PD 1, PD-L1, PD-L2, B71, B72, CTLA4, CD28, TIM3, CD4, CD8, CD 19, cadenas del receptor de linfocitos T, ICOS, ligando ICOS, HHLA2, butirofilinas, BTLA, B7-H3, B7-H4, CD3, CD79a, CD79b, IgSF CAMS (incluyendo CD2, CD58, CD48, CD150, CD229, CD244, ICAM-1), receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILR), receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR)), miembros de la superfamilia de lectina, selectinas, citocinas/quimiocina y receptores de citocina/quimiocina, factores de crecimiento y receptores del factor de crecimiento), moléculas de adhesión (integrinas, fibronectinas, cadherinas), o ecto-dominios de proteína de membrana integral multi-segmento, o reactivos de afinidad dirigidos a la superfamilia de inmunoglobulina y productos génicos enumerados. Además, los homólogos/ortólogos activos de estos productos génicos, incluyendo, pero sin limitación, secuencias virales (por ejemplo, CMV, EBV), secuencias bacterianas, secuencias fúngicas, patógenos eucariotas (por ejemplo, *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Babesia*, *Eimeria*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Leishmania*, y *Trypanosoma*), y regiones codificantes derivadas de mamíferos. Además, un MOD puede comprender un fármaco de moléculas pequeñas dirigido a un producto génico humano.

Polipéptidos Fc

Un polipéptido multimérico de la presente divulgación comprende un polipéptido Fc, u otro polipéptido de andamiaje adecuado.

Los polipéptidos de andamiaje adecuados incluyen polipéptidos de andamiaje basados en anticuerpos y andamiajes no basados en anticuerpos. Los andamiajes no basados en anticuerpos incluyen, por ejemplo, albúmina, un polipéptido (recombinante extendido), transferrina, un polipéptido del receptor Fc, un polipéptido de tipo elastina (véase, por ejemplo, Hassounah et al. (2012) *Methods Enzymol.* 502:215; por ejemplo, un polipéptido que comprende una unidad de repetición de pentapéptido (Val-Pro-Gly-X-Gly), donde X es cualquier aminoácido distinto de prolina), un polipéptido de unión a albúmina, un polipéptido de tipo seda (véase, por ejemplo, Valluzzi et al. (2002) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:165), un polipéptido de tipo seda-elastina (SELP; véase, por ejemplo, Megeed et al. (2002) *Adv Drug Deliv Rev.* 54:1075), y similares. Los polipéptidos XTEN adecuados incluyen, por ejemplo, los divulgados en los documentos WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682, y US 2009/0092582; véase, también, Schellenberger et al. (2009) *Nat Biotechnol.* 27:1186). Los polipéptidos de albúmina adecuados incluyen, por ejemplo, albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de andamiaje adecuados serán en algunos casos polipéptidos que prolongan la semivida. Por lo tanto, en algunos casos, un polipéptido de andamiaje adecuado aumenta la semivida *in vivo* (por ejemplo, la semivida en suero) del polipéptido multimérico, en comparación con un polipéptido multimérico de control que carece del polipéptido de andamiaje. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido de andamiaje aumenta la semivida *in vivo* (por ejemplo, la semivida en suero) del polipéptido multimérico, en comparación con un polipéptido multimérico de control que carece del polipéptido de andamiaje, en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, o más de 100 veces. Como un ejemplo, en algunos casos, un polipéptido Fc aumenta la semivida *in vivo* (por ejemplo, la semivida en suero) del polipéptido multimérico, en comparación con un polipéptido multimérico de control que carece del polipéptido Fc, en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, o más de 100 veces.

El polipéptido Fc de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede ser un Fc de IgG1 humana, un Fc de IgG2 humana, un Fc de IgG3 humana, un Fc de IgG4 humana, etc. En algunos casos, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de una región Fc representada en las figuras 24A-C. En algunos casos, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido Fc de IgG1 humano representado en la figura 24A. En algunos casos, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido Fc de IgG2 humano representado en la figura 24A; por ejemplo, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 99-325 del polipéptido Fc de IgG2 humano representado en la figura 24A. En algunos casos, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido Fc de IgG3 humano representado en la figura 24A; por ejemplo, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 19-246 del polipéptido Fc de IgG3 humano representado en la figura 24A. En algunos casos, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido Fc de IgM humano representado en la figura 24B; por ejemplo, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1-276 con el polipéptido Fc de IgM humano representado en la figura 24B. En algunos casos, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con el polipéptido Fc de IgA humano representado en la figura 24C; por ejemplo, el polipéptido Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1-234 con el polipéptido Fc de IgA humano representado en la figura 24C.

Polipéptidos adicionales

Una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede incluir uno o más polipéptidos además de los descritos anteriormente. Los polipéptidos adicionales adecuados incluyen etiquetas de epítipo y dominios de afinidad. El uno o más polipéptidos adicionales pueden incluirse en el extremo N-terminal de una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, en el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o internamente en una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

Etiqueta de epítipo

Las etiquetas de epítipo adecuadas incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina (HA; por ejemplo, YPYDVPDYA (SEQ ID NO:23); FLAG (por ejemplo, DYKDDDDK (SEQ ID NO:24); c-myc (por ejemplo, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:25), y similares.

Dominio de afinidad

Los dominios de afinidad incluyen secuencias peptídicas que pueden interactuar con un compañero de unión, por ejemplo, tal como uno inmovilizado en un soporte sólido, útil para identificación o purificación. Las secuencias de ADN que codifican múltiples aminoácidos individuales consecutivos, tal como histidina, cuando se fusionan con la proteína expresada, pueden usarse para la purificación en un solo paso de la proteína recombinante mediante la unión de alta afinidad a una columna de resina, tal como níquel-sepharose. Los dominios de afinidad a modo de ejemplo incluyen His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:26), HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:27), C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:25), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:24), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:28), hemagglutina, por ejemplo, etiqueta HA (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO:23), glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina, dominio de unión a celulosa, RYIRS (SEQ ID NO:30), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:31), dominio de unión a quitina, péptido S, péptido T7, dominio SH2, etiqueta de ARN de extremo C, WEAAREACCARECCARA (SEQ ID NO:32), dominios de unión a metales, por ejemplo, dominios de unión a cinc o dominios de unión a calcio tales como los de proteínas de unión a calcio, por ejemplo, calmodulina, troponina C, calcineurina B, cadena ligera de miosina, recoverina, S-modulina, visinina, VILIP, neurocalcina, hipocalcina, frequenina, caltractina, subunidad grande de calpaína, proteínas S100, parvalbúmina, calbindina D9K, calbindina D28K y calretinina, inteínas, biotina, estreptavidina, MyoD, Id, secuencias de cremallera de leucina y proteína de unión a maltosa.

Modificaciones

Un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede incluir uno o más restos no polipeptídicos unidos covalentemente al polipéptido multimérico. Los restos no polipeptídicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos; hidroxialquil almidón (HAS), por ejemplo, hidroxietilalmidón (HES); poli(etilenglicol); ácido hialurónico (HA); polímeros de heparosano (HEP); polímeros a base de fosforilcolina; dextrano; ácidos polisálicos (PSA); y similares. En algunos casos, el resto no polipeptídico aumenta la semivida *in vivo* del polipéptido multimérico, en comparación con un polipéptido multimérico de control que no comprende el resto no polipeptídico.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen radioisótopos tales como ¹²³I (yodo), ¹⁸F (flúor), ⁹⁹Tc (tecnecio), ¹¹¹In (indio), ⁶⁷Ga (galio), isótopos radiactivos de Gd (¹⁵³Gd); agentes de contraste tales como gadolinio (Gd), disprosio y hierro; una enzima que genera un producto detectable (por ejemplo, luciferasa, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares); una proteína fluorescente; una proteína cromogénica, colorante (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y similares); metales emisores de fluorescencia, por ejemplo, ¹⁵²Eu u otros de la serie de los lantánidos; compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo, luminol, isoluminol, sales de acridinio y similares; compuestos bioluminiscentes; y similares.

Actividad

Dependiendo de la naturaleza del polipéptido inmunomodulador ("MOD") presente en un polipéptido multimérico de la presente divulgación, el polipéptido multimérico puede activar o inhibir un linfocito T diana. Un polipéptido multimérico de la presente divulgación activa o inhibe selectivamente un linfocito T diana que es específico para el epítipo presente en el polipéptido multimérico. Los "linfocitos T diana" incluyen linfocitos T CD4⁺ específicos de epítipo, linfocitos T CD8⁺ específicos de epítipo. En algunos casos, el linfocito T CD4⁺ diana es un linfocito T auxiliar (por ejemplo, una célula Th1, Th2 o Th17). En algunos casos, el linfocito T CD4⁺ diana es un linfocito T regulador CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg). En algunos casos, el linfocito T diana es un linfocito T CD8⁺ y es un linfocito T citotóxico. En algunos casos, el linfocito T diana es un linfocito T de memoria, que puede ser un linfocito T CD4⁺ o un linfocito T CD8⁺, donde los linfocitos T son generalmente CD45RO⁺. En algunos casos, el linfocito T diana es una célula NK-T.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación mejora la localización y el tráfico de linfocitos T. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la extravasación del linfocito T diana a un sitio de tratamiento. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la extravasación del linfocito T diana a un sitio de tratamiento en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o más de 100 veces, en comparación con el nivel de extravasación del linfocito T diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico. El aumento de la extravasación puede aumentar el número de linfocitos T en un sitio de tratamiento. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta el número de linfocitos T en un sitio de tratamiento.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación aumenta la expresión por un linfocito T diana de una o más proteínas que median o regulan el tráfico de linfocitos por el linfocito T diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta el nivel de una o más moléculas de adhesión y/o moléculas del receptor de quimiocina en el linfocito T diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la expresión de una o más moléculas de adhesión y/o moléculas del receptor de quimiocina por el linfocito T diana en al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al

menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o más de 100 veces, en comparación con el nivel de la molécula de adhesión y/o la molécula del receptor de quimiocinas producida por el linfocito T diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico. Los ejemplos de moléculas de adhesión incluyen moléculas de adhesión producidas por linfocitos T CD8, donde los ejemplos de dichas moléculas de adhesión incluyen, pero sin limitación, CD44, LFA-1 y VLA-4. Los ejemplos de receptores de quimiocinas incluyen los receptores de quimiocinas producidos por los linfocitos T CD8, donde los ejemplos de dichos receptores de quimiocinas incluyen, pero sin limitación, CCR5, CCR7 y CXCR3.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación da como resultado la generación de linfocitos T de memoria capaces de respuestas rápidas citotóxicas contra un epítipo previamente experimentado. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, da como resultado la generación de linfocitos T de memoria que comprende 0,5 % o más del grupo de linfocitos T específicos de antígeno. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, da como resultado la generación de linfocitos T de memoria que comprende el 0,5 % o más, el 1 % o más, el 2 % o más, el 3 % o más, el 4 % o más, el 5 % o más, el 10 % o más, el 15 % o más, o el 20 % o más, del grupo de linfocitos T específicos de antígeno. Un ejemplo de un marcador de superficie celular de linfocitos T de memoria es CD45RO.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación aumenta la proliferación de un linfocito T diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la proliferación del linfocito T diana en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o más de 100 veces, en comparación con la proliferación del linfocito T diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación aumenta la actividad citotóxica de un linfocito T hacia una célula diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la actividad citotóxica del linfocito T hacia una célula diana en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o más de 100 veces, en comparación con la actividad citotóxica del linfocito T hacia la célula diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico. Las dianas de los linfocitos T incluyen células infectadas por virus, células cancerosas y similares.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación aumenta la producción de citocinas por un linfocito T diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, aumenta la producción de citocinas por el linfocito T en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, o más de 100 veces, en comparación con el nivel de citocina producido por el linfocito T diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico. Los ejemplos de citocinas incluyen citocinas producidas por células Th1, por ejemplo, IL-2, IFN- γ , y TNF- α ; citocinas producidas por células Th17, por ejemplo, IL-17, IL-21, e IL-22; citocinas producidas por células Treg, por ejemplo, TGF- β , IL-35, e IL-10.

En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación inhibe la producción de citocinas por un linfocito T diana. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, cuando se pone en contacto con un linfocito T diana, inhibe la producción de citocinas por un linfocito T diana en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o más del 90 %, en comparación con el nivel de citocina producido por el linfocito T diana que no está en contacto con el polipéptido multimérico. Los ejemplos de citocinas incluyen citocinas producidas por células Th2, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13.

Realizaciones a modo de ejemplo

Los ejemplos no limitantes de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen:

- 1) un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo de linfocitos T; ii) un polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I; y iii) un polipéptido 4-BBL; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; y ii) un polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un polipéptido enlazador entre el epítipo y el polipéptido de β 2-microglobulina. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido enlazador, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro

[illegible]

[illegible]

estas realizaciones, el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I y/o el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I incluyen una sustitución de aminoácidos para proporcionar una cisteína que participa en el enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido y el tercer polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en (o sustituido en) el primer y el segundo polipéptidos CD86. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG2. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG3. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgA o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, se usan polipéptidos MHC de Clase II en lugar de los polipéptidos MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye una etiqueta de epítipo y/o un dominio de afinidad C-terminal al polipéptido Fc;

30) un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo de linfocitos T; ii) un polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I; y iii) un polipéptido CD80; b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; y ii) un polipéptido Fc de Ig; y c) un tercer polipéptido que comprende un polipéptido CD86. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí; y el primer y el tercer polipéptidos están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un polipéptido enlazador entre el epítipo y el polipéptido de β 2-microglobulina. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido enlazador, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; en algunas de estas realizaciones, el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I y/o el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I incluyen una sustitución de aminoácidos para proporcionar una cisteína que participa en el enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido y el tercer polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en (o sustituido en) el polipéptido CD80 y los polipéptidos CD86. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG2. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG3. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgA o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, se usan polipéptidos MHC de Clase II en lugar de los polipéptidos MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye una etiqueta de epítipo y/o un dominio de afinidad C-terminal al polipéptido Fc; y

31) un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo de linfocitos T; ii) un polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I; y iii) un primer polipéptido PD-L2; b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; y ii) un polipéptido Fc de Ig; y c) un tercer polipéptido que comprende un segundo polipéptido PD-L2. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí; y el primer y el tercer polipéptidos están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un polipéptido enlazador entre el epítipo y el polipéptido de β 2-microglobulina. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido enlazador, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; en algunas de estas realizaciones, el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I y/o el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I incluyen una sustitución de aminoácidos para proporcionar una cisteína que participa en el enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido y el tercer polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en (o sustituido en) el primer y el segundo polipéptidos PD-L2. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG2. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG3. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgA o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, se usan polipéptidos MHC de Clase II en lugar de los polipéptidos MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye una etiqueta de epítipo y/o un dominio de afinidad C-terminal al polipéptido Fc; y

32) un polipéptido multimérico que comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítipo de linfocitos T; ii) un polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I; y iii) un primer polipéptido FasL; b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; y ii) un polipéptido Fc de Ig; y c) un tercer polipéptido que comprende un segundo polipéptido FasL. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí; y el primer y el tercer polipéptidos están unidos por disulfuro entre sí. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un polipéptido enlazador entre el epítipo y el polipéptido de β 2-microglobulina. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido enlazador, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I, y un residuo cisteína presente en el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I; en algunas de

estas realizaciones, el polipéptido de β 2-microglobulina MHC de Clase I y/o el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I incluyen una sustitución de aminoácidos para proporcionar una cisteína que participa en el enlace disulfuro. En algunos casos, el primer polipéptido y el tercer polipéptido están unidos por disulfuro entre sí a través de un residuo cisteína presente en (o sustituido en) el primer y el segundo polipéptidos FasL. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG2. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG3. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgA o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, se usan polipéptidos MHC de Clase II en lugar de los polipéptidos MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye una etiqueta de epítipo y/o un dominio de afinidad C-terminal al polipéptido Fc.

PRECURSORES DE POLIPROTEÍNA

Esta divulgación proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia líder de B2M contigua a un péptido de epítipo candidato contiguo a una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia peptídica del dominio modulador de linfocitos T contigua a un tercer enlazador de aminoácidos contiguo a una segunda secuencia líder de B2M contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una cadena pesada MHC contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina.

El primer aminoácido puede ser cualquier secuencia de aminoácidos de 50 aminoácidos o menos a un mínimo de 5 aminoácidos. El segundo enlazador de aminoácidos puede ser cualquier secuencia de aminoácidos de 70 aminoácidos o menos a un mínimo de 5 aminoácidos. El tercer enlazador de aminoácidos puede ser un péptido viral 2A o un péptido con capacidad conocida de escisión de proteasa (por ejemplo, un sitio de escisión de furina, secuencia del virus del grabado del tabaco [TEV], sitio de proteasa de precisión o proteasa de trombina). Por ejemplo, el primer aminoácido comprende GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1). En otro ejemplo, el segundo enlazador de aminoácidos comprende GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:2). En otro ejemplo, el tercer enlazador de aminoácidos comprende SGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:3).

Esta divulgación también proporciona un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia líder de B2M contigua a un epítipo peptídico candidato contiguo a una primera secuencia de enlazador de aminoácidos contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de péptido B2M nativa humana contigua a una segunda secuencia de enlazador de aminoácidos con una segunda secuencia líder de B2M contigua a una secuencia peptídica del dominio modulador de linfocitos T contigua a un tercer enlazador de aminoácidos contiguo a una secuencia de aminoácidos idéntica a una cadena pesada MHC contigua a una secuencia de aminoácidos idéntica a un dominio Fc de inmunoglobulina.

Enlazadores

El primer aminoácido puede ser cualquier secuencia de aminoácidos de 50 aminoácidos o menos a un mínimo de 5 aminoácidos. El segundo enlazador de aminoácidos puede ser cualquier secuencia de aminoácidos de 70 aminoácidos o menos a un mínimo de 5 aminoácidos. El tercer enlazador de aminoácidos puede ser un péptido viral 2A o un péptido con capacidad conocida de escisión de proteasa (por ejemplo, un sitio de escisión de furina, secuencia del virus del grabado del tabaco [TEV], sitio de proteasa de precisión o proteasa de trombina). Por ejemplo, el primer aminoácido comprende GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1). En otro ejemplo, el segundo enlazador de aminoácidos comprende GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:2). En un ejemplo adicional, el tercer enlazador de aminoácidos comprende SGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:3).

En un ejemplo de los polipéptidos recombinantes, el tercer enlazador de aminoácidos es autoescindible. En un ejemplo de los polipéptidos recombinantes, el segundo enlazador de aminoácidos es autoescindible. En un ejemplo de los polipéptidos recombinantes, el péptido de autoescisión es un péptido viral 2A o tiene la secuencia del mismo. En una realización, el péptido viral 2A es un teschovirus-1 porcino (P2A), virus de la fiebre aftosa (F2A), virus de *Thosea asigna* (T2A), virus de la rinitis equina A (E2A) o teschovirus-1 viral porcino (P2A), o tiene la secuencia de uno de los mismos. Como alternativa, esto también puede administrarse como dos plásmidos (o virus) separados, eliminando la secuencia 2A por completo.

El enlazador proteolíticamente escindible puede incluir una secuencia de reconocimiento de proteasa reconocida por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en alanina carboxipeptidasa, astacina de *Armillaria mellea*, leucil aminopeptidasa bacteriana, procoagulante de cáncer, cathepsina B, clostripaína, citosol alanil aminopeptidasa, elastasa, endoproteinasa Arg-C, enterocinasa, gastricsina, gelatinasa, Gly-X carboxipeptidasa, glicil endopeptidasa, proteasa de rinovirus 3C humana, hipodermina C, serina endopeptidasa específica de IgA, leucil aminopeptidasa, leucil endopeptidasa, lysC, pro-X carboxipeptidasa lisosomal, lisil aminopeptidasa, metionil aminopeptidasa, myxobacter, nardilisina, endopeptidasa E pancreática, picornaína 2A, picornaína 3C, proendopeptidasa, prolil aminopeptidasa, proproteína convertasa I, proproteína convertasa II, ruselisina, sacaropepsina, seminogelasa, activador de plasminógeno T, trombina, caliceína tisular, virus del grabado del tabaco (TEV), togavirina, triptofanil aminopeptidasa, activador del plasminógeno U, V8, venombina A, venombina AB y Xaa-pro aminopeptidasa. En

algunos casos, el enlazador proteolíticamente escindible puede incluir una secuencia de reconocimiento de proteasa reconocida por una enzima huésped, por ejemplo, una enzima producida naturalmente por la célula huésped.

Por ejemplo, el enlazador proteolíticamente escindible puede comprender un sitio de escisión de metaloproteinasa de matriz, por ejemplo, un sitio de escisión para una MMP seleccionada de collagenasa-1, -2, y -3 (MMP-1, -8, y -13), gelatinasa A y B (MMP-2 y -9), estromelina 1, 2, y 3 (MMP-3, -10, y -11), matrilisina (MMP-7), y metaloproteinasas de membrana (MT1-MMP y MT2-MMP). Por ejemplo, la secuencia de escisión de MMP-9 es Pro-X-X-Hy (donde, X representa un residuo arbitrario; Hy, un residuo hidrófobo), por ejemplo, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr), por ejemplo, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO:33) o Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO:21). Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión activador de plasminógeno, por ejemplo, un sitio de escisión uPA o un sitio de escisión de activador de plasminógeno tisular (tPA). Los ejemplos específicos de secuencias de escisión de uPA y tPA incluyen secuencias que comprenden Val-Gly-Arg. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV), por ejemplo, ENLYTQS (SEQ ID NO:34), donde la proteasa se escinde entre la glutamina y la serina. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de enterocinasa, por ejemplo, DDDDK (SEQ ID NO:35), donde la escisión tiene lugar después del residuo de lisina. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de trombina, por ejemplo, LVPR (SEQ ID NO:36). Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de furina, por ejemplo, Arg-X-(Arg/Lys)-Arg, donde X es cualquier aminoácido. Los enlazadores adecuados adicionales que comprenden sitios de escisión de proteasa incluyen enlazadores que comprenden una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: LEVLFGQP (SEQ ID NO:37), escindida por la proteasa PreScission (una proteína de fusión que comprende proteasa de rinovirus 3C humana y glutatión-S-transferasa; Walker et al. (1994) *Biotechnol.* 12:601); un sitio de escisión de trombina, por ejemplo, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO:38); SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO:39) o SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO:40), escindida por cathepsina B; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO:41) o SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO:42), escindida por una proteasa del virus Epstein-Barr; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO:43) escindida por MMP-3 (estromelina); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO:44) escindida por MMP-7 (matrilisina); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO:45) escindida por MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO:46) escindida por una MMP de tipo termolisina; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO:47) escindida por metaloproteinasa 2 de matriz (MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO:48) escindida por cathepsina L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO:49) escindida por cathepsina D; SLGPQGIWQGFN (SEQ ID NO:50) escindida por metaloproteinasa 1 de matriz (MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO:51) escindida por activador del plasminógeno de tipo urocinasa; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO:52) escindida por metaloproteinasa de matriz 1 de tipo membrana (MT-MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPT (SEQ ID NO:53) escindida por estromelina 3 (o MMP-11), termolisina, collagenasa de fibroblastos y estromelina-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO:54) escindida por metaloproteinasa de matriz 13 (colagenasa-3); GSGGQRGRKALE (SEQ ID NO:55) escindida por activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO:56) escindida por antígeno específico de próstata humano; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO:57) escindida por calicreína (hK3); SLLGIAPGNFN (SEQ ID NO:58) escindida por elastasa de neutrófilos; y FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO:59) escindida por calpaína (proteasa neutra activada por calcio). Ejemplos adicionales de enlazadores proteolíticamente escindibles adecuados incluyen: 1) ATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:60); 2) EGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO:61); 3) QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:62); y 4) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:63). Ejemplos adicionales de enlazadores proteolíticamente escindibles adecuados incluyen: 1) GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64); 2) GSGEGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO:65); 3) GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:66); y 4) GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:67).

Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen enlazadores 2A (por ejemplo, T2A), enlazadores de tipo 2A o equivalentes funcionales de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los enlazadores incluyen el enlazador picornaviral de tipo 2A, secuencias CHYSEL de teschovirus porcino (P2A), virus de Thossea asigna (T2A) y combinaciones, variantes y equivalentes funcionales de los mismos. En otras realizaciones, las secuencias enlazadoras pueden comprender el motivo Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^{2A}-Pro^{2B}, que da como resultado la escisión entre la glicina 2A y la prolina 2B. Para los fines de la presente divulgación, P2A (GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64)), T2A (GSGEGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO:65)), E2A (GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:66)), y F2A (GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:67)) pueden considerarse como "sitios de escisión proteolítica" o "señales de omisión de ribosomas" (CHYSEL). Véase, por ejemplo, Kim et al. (2011) *PLoS ONE* 6:e 18556. El mecanismo por el cual los polipéptidos codificados se generan como dos cadenas de polipéptidos puede ser por autoescisión del enlazador, por omisión de ribosomas, o derivación traslacional. Independientemente del mecanismo, las al menos dos cadenas polipeptídicas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación pueden producirse usando una secuencia P2A, T2A, E2A o F2A. Los enlazadores adecuados incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos tal como GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64), GSGEGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO:65), GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:66), GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:67), o una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 64- 67 (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 5 sustituciones conservativas de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 64-67). Los enlazadores adecuados incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos tal como GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64), GSGEGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO:65),

GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:66), GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:67), o una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 64-67 (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 10 sustituciones conservativas de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 64-67).

Epítopos

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el epítipo candidato comprende 7-20 aminoácidos. En una realización de los polipéptidos recombinantes, el epítipo peptídico tiene 5-20 aminoácidos para MHC de Clase I. En una realización, el epítipo peptídico tiene 8-11 aminoácidos para MHC de Clase I. En una realización, el epítipo peptídico tiene 5-40 aminoácidos para MHC de Clase II. En una realización, el epítipo peptídico tiene 13-17 aminoácidos para MHC de Clase II. En una realización, el epítipo peptídico es cualquier secuencia de origen natural o humana mutante, o cualquier secuencia derivada de un patógeno.

Polipéptidos MHC

En una realización de los polipéptidos recombinantes, la primera y/o segunda secuencia líder de B2M tiene la secuencia de la secuencia líder de B2M humana.

En algunos casos, un péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con la siguiente secuencia líder de B2M humana: MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO:68).

En algunos casos, una secuencia líder de B2M como se describe en el presente documento puede ser una secuencia líder de B2M de mamífero incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, una secuencia líder de B2M humana, una secuencia líder de B2M de primate, una secuencia líder de B2M de roedor, y similares. En algunos casos, un líder de B2M como se describe en el presente documento, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las secuencias líder de B2M representadas en la figura 20.

En una realización, la B2M comprende la secuencia:

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYA
CRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:4).

En algunos casos, un polipéptido B2M comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de B2M representada en la figura 20.

En una realización de los polipéptidos recombinantes, la cadena pesada MHC es una cadena pesada MHC humana. En una realización de los polipéptidos recombinantes, la cadena pesada MHC es una molécula MHC I. Las cadenas pesadas MHC I a modo de ejemplo incluyen la cadena alfa de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-K y HLA-L. En una realización de los polipéptidos recombinantes, la cadena pesada MHC es un HLA-A02:01. En una realización, el HLA es HLA-A02. En una realización, el HLA-A02 comprende la secuencia:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQE

GPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLR

GYHQYAYDGKDYLKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWAAHVAEQLRAYLEGTCVEW

LRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQT

QDTELVETRPAGDGTGFKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID

NO:5).

En una realización de los polipéptidos recombinantes, la cadena pesada MHC es una molécula MHC II. Las cadenas pesadas MHC II a modo de ejemplo incluyen las de HLA-D.

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el polipéptido recombinante comprende además una mutación en una secuencia de péptido B2M nativa humana del mismo, y en la secuencia de cadena pesada del mismo, para realizar un enlace disulfuro entre la secuencia del péptido B2M y la secuencia de cadena pesada.

- 5 En una realización de los polipéptidos recombinantes, el polipéptido recombinante de la secuencia de cadena pesada es un HLA y el enlace disulfuro se une a uno de los siguientes pares de residuos:

10 residuo B2M 12, residuo HLA 236;
residuo B2M 12, residuo HLA 237;
residuo B2M 8, residuo HLA 234;
residuo B2M 10, residuo HLA 235;
residuo B2M 24, residuo HLA 236;
residuo B2M 28, residuo HLA 232;
residuo B2M 98, residuo HLA 192;
15 residuo B2M 99, residuo HLA 234;
residuo B2M 3, residuo HLA 120;
residuo B2M 31, residuo HLA 96;
residuo B2M 53, residuo HLA 35;
residuo B2M 60, residuo HLA 96;
20 residuo B2M 60, residuo HLA 122;
residuo B2M 63, residuo HLA 27;
residuo B2M Arg3, residuo HLA Gly120;
residuo B2M His31, residuo HLA Gln96;
residuo B2M Asp53, residuo HLA Arg35;
25 residuo B2M Trp60, residuo HLA Gln96;
residuo B2M Trp60, residuo HLA Asp 122;
residuo B2M Tyr63, residuo HLA Tyr27;
residuo B2M Lys6, residuo HLA Glu232;
residuo B2M Gln8, residuo HLA Arg234;
30 residuo B2M Tyr10, residuo HLA Pro235;
residuo B2M Ser11, residuo HLA Gln242;
residuo B2M Asn24, residuo HLA Ala236;
residuo B2M Ser28, residuo HLA Glu232;
residuo B2M Asp98, residuo HLA His 192; y
35 residuo B2M Met99, residuo HLA Arg234
(Véanse las SEQ ID NO:s 4 y 5 para las secuencias B2M y HLA).

En una realización de los polipéptidos recombinantes, la secuencia de cadena pesada es un HLA y donde el enlace disulfuro se une a uno de los siguientes pares de residuos:

40 primera posición del enlazador Gly 2, posición de la cadena pesada (HLA) Tyr 84;
posición de la cadena ligera (B2M) Arg 12, HLA Ala236; y/o
residuo B2M Arg12, residuo HLA Gly237.

45 Polipéptidos Fc

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG. En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgA. En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgM. En una
50 realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de inmunoglobulina humano. En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1.

55 Polipéptidos inmunomoduladores

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio inhibidor.

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio modulador de linfocitos T es un dominio estimulador.

60 En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio modulador de linfocitos T es un anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo, un ligando peptídico, un péptido coestimulador de linfocitos T, una citocina o una toxina.

En una realización de los polipéptidos recombinantes, el dominio modulador de linfocitos T comprende un péptido PD-L1, el dominio variable de Ig de un péptido PD-L1, el dominio modulador de linfocitos T comprende 4-1BBL, el
65 dominio modulador de linfocitos T comprende B7-1W88A, o el dominio modulador de linfocitos T comprende Fv monocatenario anti-CD28.

Los dominios moduladores de linfocitos T (MOD) adicionales que se pueden emplear en la invención incluyen productos génicos humanos (proteínas) de origen natural o sintéticos, reactivos de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv monocatenarios, aptámeros, nanocuerpo) dirigidos a un producto génico humano, incluyendo, pero sin limitación, todas las proteínas secretadas que surgen de los mecanismos de secreción habituales y no habituales (por ejemplo, FGF2, IL1, S100A4), y ectodominios de todas las proteínas de superficie celular ancladas por segmentos de proteínas genéticamente codificados de origen natural (tramos de membrana simples o múltiples) o modificaciones postraduccionales tales como enlaces GPI). Cualquier reactivo de afinidad de origen natural o sintético (por ejemplo, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv monocatenarios, aptámero, nanocuerpo, lectina, etc.) dirigido a un glicano de superficie celular u otra modificación postraduccional (por ejemplo, sulfatación). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, miembros de la familia TNF/TNFR (OX40L, ICOSL, FASL, LTA, LTB TRAIL, CD 153, TNFSF9, RANKL, TWEAK, TNFSF13, TNFSF13b, TNFSF14, TNFSF15, TNFSF18, CD40LG, CD70) o reactivos de afinidad dirigidos a los miembros de la familia TNF/TNFR; miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (VISTA, PD 1, PD-L1, PD-L2, B71, B72, CTLA4, CD28, TIM3, CD4, CD8, CD 19, cadenas del receptor de linfocitos T, ICOS, ligando ICOS, HHLA2, butirofilinas, BTLA, B7-H3, B7-H4, CD3, CD79a, CD79b, IgSF CAMS (incluyendo CD2, CD58, CD48, CD150, CD229, CD244, ICAM-1), receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILR), receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR)), miembros de la superfamilia de lectina, selectinas, citocinas/quimiocina y receptores de citocina/quimiocina, factores de crecimiento y receptores del factor de crecimiento), moléculas de adhesión (integrinas, fibronectinas, cadherinas), o ecto-dominios de proteína de membrana integral multi-segmento, o reactivos de afinidad dirigidos a la superfamilia de inmunoglobulina y productos génicos enumerados. Además, los homólogos/ortólogos activos de estos productos génicos, incluyendo, pero sin limitación, secuencias virales (por ejemplo, CMV, EBV), secuencias bacterianas, secuencias fúngicas, patógenos eucariotas (por ejemplo, *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Babesia*, *Eimeria*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Leishmania*, y *Trypanosoma*), y resiones codificantes derivadas de mamífero. Además, un MOD puede comprender un fármaco de moléculas pequeñas dirigido a un producto génico humano.

Polipéptidos adicionales

En una realización de los polipéptidos recombinantes, comprenden adicionalmente una etiqueta His-8 contigua al extremo C-terminal de los mismos.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Se proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos recombinantes descritos en el presente documento. En una realización, el ácido nucleico es un ADN. En una realización, el ácido nucleico es un ADNc. En una realización, el ácido nucleico es un ARN. En una realización, el ácido nucleico es un ARNm.

En una realización, el ácido nucleico recombinante es un vector. En una realización, el vector es un vector viral. En una realización, el vector viral es un vector lentiviral.

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, las cadenas polipeptídicas individuales de un polipéptido multimérico de la presente divulgación se codifican en ácidos nucleicos separados. En algunos casos, todas las cadenas polipeptídicas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación se codifican en un solo ácido nucleico. En algunos casos, un primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y un segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, un ácido nucleico individual comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación y un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un precursor de poliproteína, como se ha descrito anteriormente.

Ácidos nucleicos separados que codifican cadenas polipeptídicas individuales de un polipéptido multimérico

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico de la presente divulgación. Como se ha apreciado anteriormente, en algunos casos, las cadenas polipeptídicas individuales de un polipéptido multimérico de la presente divulgación se codifican en ácidos nucleicos separados. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas separadas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación están unidas operativamente a elementos de control transcripcional, por ejemplo, promotores, tales como promotores que son funcionales en una célula eucariota, donde el promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible.

La presente divulgación proporciona un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, donde el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítipo (por ejemplo, un epítipo de linfocitos T); b) un primer polipéptido MHC; y c) un polipéptido

inmunomodulador; y donde el segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un segundo polipéptido MHC; y b) un polipéptido Fc de Ig. Los epítomos de linfocitos T adecuados, los polipéptidos MHC, los polipéptidos inmunomoduladores y los polipéptidos Fc de Ig se han descrito anteriormente. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican el primer y el segundo polipéptidos están unidas operativamente a elementos de control transcripcionales. En algunos casos, el elemento de control transcripcional es un promotor que es funcional en una célula eucariota. En algunos casos, los ácidos nucleicos están presentes en vectores de expresión separados.

La presente divulgación proporciona un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, donde el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítomo (por ejemplo, un epítomo de linfocitos T); y b) un primer polipéptido MHC; y donde el segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un polipéptido inmunomodulador; b) un segundo polipéptido MHC; y c) un polipéptido Fc de Ig. Los epítomos de linfocitos T adecuados, los polipéptidos MHC, los polipéptidos inmunomoduladores y los polipéptidos Fc de Ig se han descrito anteriormente. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican el primer y el segundo polipéptidos están unidas operativamente a elementos de control transcripcionales. En algunos casos, el elemento de control transcripcional es un promotor que es funcional en una célula eucariota. En algunos casos, los ácidos nucleicos están presentes en vectores de expresión separados.

Ácido nucleico que codifica dos o más polipéptidos presentes en un polipéptido multimérico

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que codifican al menos el primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, cuando un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye un primer, segundo y tercer polipéptido, el ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el primer, segundo y tercer polipéptidos. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican el primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen un enlazador proteolíticamente escindible interpuesto entre la secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido y la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican el primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen un sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) interpuesto entre la secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido y la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos que codifican el primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluyen una señal de ausencia del ribosoma (o un elemento hidrolasa de actuación en *cis*, CHYSEL) interpuesto entre la secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido y la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido. A continuación se describen ejemplos de ácidos nucleicos, donde se proporciona un enlazador proteolíticamente escindible entre las secuencias de nucleótidos que codifican el primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; en cualquiera de estas realizaciones, puede usarse IRES o una señal de ausencia del ribosoma en lugar de la secuencia de nucleótidos que codifica el enlazador proteolíticamente escindible.

En algunos casos, un primer ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión recombinante, un ARNm, un ARN viral, etc.) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y un segundo ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión recombinante, un ARNm, un ARN viral, etc.) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido, y la segunda secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido, están unidas cada una operativamente a elementos de control transcripcional, por ejemplo, promotores, tales como promotores que son funcionales en una célula eucariota, donde el promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible.

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante, donde el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítomo (por ejemplo, un epítomo de linfocitos T); b) un primer polipéptido MHC; c) un polipéptido inmunomodulador; d) un enlazador proteolíticamente escindible; e) un segundo polipéptido MHC; y f) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante, donde el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un primer péptido líder; b) el epítomo; c) el primer polipéptido MHC; d) el polipéptido inmunomodulador; e) el enlazador proteolíticamente escindible; f) un segundo péptido líder; g) el segundo polipéptido MHC; y h) el polipéptido Fc de Ig. La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante, donde el polipéptido recombinante comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un epítomo; b) un primer polipéptido MHC; c) un enlazador proteolíticamente escindible; d) un polipéptido inmunomodulador; e) un segundo polipéptido MHC; y f) un

polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el primer péptido líder y el segundo péptido líder es un péptido líder β -M. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un elemento de control transcripcional. En algunos casos, el elemento de control transcripcional es un promotor que es funcional en una célula eucariota.

Los polipéptidos MHC adecuados se han descrito anteriormente. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I. En algunos casos, el polipéptido de β 2-microglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de Clase I es una cadena pesada HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-K, o HLA-L. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada MHC de clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el primer polipéptido MHC es un polipéptido de cadena alfa MHC de Clase II; y donde el segundo polipéptido MHC es un polipéptido de cadena beta MHC de Clase II.

Los polipéptidos Fc adecuados se han descrito anteriormente. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1, un polipéptido Fc de IgG2, un polipéptido Fc de IgG3, un polipéptido Fc de IgG4, un polipéptido Fc de IgA, o un polipéptido Fc de IgM. En algunos casos, el polipéptido Fc de Ig comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las figuras 24A-24C.

Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados se han descrito anteriormente. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL, y un polipéptido PD-L2. En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador se selecciona de CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA- G, MICA, MICB, HVEM, beta receptora de linfotóxina, 3TR6, ILT3, ILT4, y HVEM.

Los enlazadores proteolíticamente escindibles adecuados se han descrito anteriormente. En algunos casos, el enlazador proteolíticamente escindible comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:37); b) ENLYTQS (SEQ ID NO:34); c) DDDDK (SEQ ID NO:35); d) LVPR (SEQ ID NO:36); y e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:64).

En algunos casos, un enlazador entre el epítipo y el primer polipéptido MHC comprende un primer residuo Cys, y el segundo polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, de tal forma que el primer y el segundo residuos Cys proporcionan un enlace disulfuro entre el enlazador y el segundo polipéptido MHC. En algunos casos, el primer polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un primer residuo Cys, y el segundo polipéptido MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, de tal forma que el primer residuo Cys y el segundo residuo Cys proporcionan un enlace disulfuro entre el primer polipéptido MHC y el segundo polipéptido MHC.

Vectores de expresión recombinante

La presente divulgación proporciona vectores de expresión recombinante que comprenden ácidos nucleicos de la presente divulgación. En algunos casos, el vector de expresión recombinante es un vector no viral. En algunas realizaciones, el vector de expresión recombinante es una construcción viral, por ejemplo, una construcción de virus adenoasociado recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.078.387), una construcción adenoviral recombinante, una construcción lentiviral recombinante, una construcción retroviral recombinante, un vector viral no integrante, etc.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, vectores virales (por ejemplo, vectores virales basados en virus vaccinia; poliovirus; adenovirus (véanse, por ejemplo, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li y Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; documentos WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655); virus adeno-asociado (véanse, por ejemplo, Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava en el documento WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; y Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; virus del herpes simple; virus de inmunodeficiencia humana (véanse, por ejemplo, Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); un vector retroviral (por ejemplo, virus de la leucemia murina, virus de la necrosis del bazo y vectores derivados de retrovirus tales como virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, un lentivirus, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma mieloproliferativo, y virus del tumor mamario); y similares.

Se conocen numerosos vectores de expresión por los expertos en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo; para células huésped eucariotas: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro

vector siempre que sea compatible con la célula huésped.

Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, puede usarse en el vector de expresión cualquiera de una serie de elementos de control de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN dirigido a ADN y/o un polipéptido modificador de sitio dirigido se une operativamente a un elemento de control, por ejemplo, un elemento de control transcripcional, tal como un promotor. El elemento de control transcripcional puede ser funcional en una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero; o una célula procariota (por ejemplo, una célula bacteriana o arqueal). En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN dirigido al ADN y/o un polipéptido modificador de sitio dirigido, se une operativamente a múltiples elementos de control que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica un ARN dirigido al ADN y/o un polipéptido modificador de sitio dirigido tanto en células procariotas como eucariotas.

Los ejemplos no limitativos de promotores eucariotas adecuados (promotores funcionales en una célula eucariota) incluyen los de citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (HSV) inmediato temprano, timidina cinasa, SV40 temprano y tardío, repeticiones terminales largos (LTR) de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de habilidad ordinaria en la técnica. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector de expresión también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

CÉLULAS HUÉSPED MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

Se proporciona una célula transformada con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos recombinantes descritos en el presente documento. Los ejemplos de células que pueden transformarse con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos recombinantes incluyen células de mamífero aisladas, incluyendo, pero sin limitación, riñón embrionario humano (HEK), ovario de hámster chino (CHO), células NS0 (mieloma murino), células amniocíticas humanas (CAP, CAP-T), células de levadura (incluyendo, pero sin limitación, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células vegetales (incluyendo, pero sin limitación, NT1 del tabaco, BY-2), células de insecto (incluyendo, pero sin limitación, SF9, S2, SF21, Tni (por ejemplo, High 5)) o células bacterianas (incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*).

La presente divulgación proporciona una célula huésped modificada genéticamente, donde la célula huésped está modificada genéticamente con un ácido nucleico de la presente divulgación.

Las células huésped adecuadas incluyen células eucariotas, tales como células de levadura, células de insecto y células de mamífero. En algunos casos, la célula huésped es una célula de una línea celular de mamífero. Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares humanas, líneas celulares de primates no humanos, líneas celulares de roedores (por ejemplo, ratones, ratas) y similares. Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitación, células HeLa (por ejemplo, Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) N.º CCL-2), células CHO (por ejemplo, ATCC N.º CRL9618, CCL61, CRL9096), células 293 (por ejemplo, ATCC N.º CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (por ejemplo, ATCC N.º CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por ejemplo, ATCC N.º CCL10), células PC12 (ATCC N.º CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC N.º CRL1651), células RAT1, células L de ratón (ATCC N.º CCL1.3), células de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC N.º CRL1573), células HLHepG2, y similares.

En algunos casos, la célula huésped es una célula de mamífero que se ha modificado genéticamente de modo que no sintetiza la β 2-M MHC endógena.

MÉTODOS PARA PRODUCIR UN POLIPÉPTIDO MULTIMÉRICO

La presente divulgación proporciona métodos para producir un polipéptido multimérico de la presente divulgación. Los métodos implican generalmente cultivar, en un medio de cultivo, una célula huésped que está modificada genéticamente con un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido multimérico; y aislar el polipéptido multimérico de la célula huésped modificada genéticamente y/o el medio de cultivo. Una célula huésped que está modificada genéticamente con un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido multimérico también se denomina "huésped de expresión". Como se ha apreciado anteriormente, en algunos casos, las cadenas polipeptídicas individuales de un polipéptido multimérico de la presente divulgación se codifican en vectores recombinantes separados. En algunos casos, todas las cadenas polipeptídicas de un polipéptido multimérico de la presente divulgación se codifican en un solo vector de expresión recombinante.

El aislamiento del polipéptido multimérico de la célula huésped de expresión (por ejemplo, de un lisado de la célula huésped de expresión) y/o el medio de cultivo en el que se cultiva la célula huésped, se puede realizar usando

métodos estándar de purificación de proteínas.

Por ejemplo, se puede preparar un lisado del huésped de expresión y se purifica el lisado usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Como alternativa, cuando el polipéptido multimérico se secreta desde la célula huésped de expresión al medio de cultivo, el polipéptido multimérico se puede purificar del medio de cultivo usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. En algunos casos, las composiciones que se usan comprenderán al menos el 80 % en peso del producto deseado, al menos aproximadamente el 85 % en peso, al menos aproximadamente el 95 % en peso, o al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Los porcentajes pueden basarse en la proteína total.

En algunos casos, por ejemplo, cuando el polipéptido multimérico comprende una etiqueta de afinidad, el polipéptido multimérico puede purificarse usando un compañero de unión inmovilizado de la etiqueta de afinidad.

COMPOSICIONES

La presente divulgación proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido multimérico de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación.

Composiciones que comprenden un polipéptido multimérico

Una composición de la presente divulgación puede comprender, además de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, uno o más de: una sal, por ejemplo, NaCl, MgCl, KCl, MgSO₄, etc.; un agente tamponante, por ejemplo, un tampón Tris, N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), sal sódica del ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), etc.; un agente solubilizante; un detergente, por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20, etc.; un inhibidor de proteasa; glicerol; y similares.

La composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, varios de los cuales se conoce en la técnica y no ha de analizarse en detalle en el presente documento. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en diversas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19ª Ed. (1995), o la última edición, Mack Publishing Co; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds 7ª ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Una composición farmacéutica puede comprender un polipéptido multimérico de la presente divulgación, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una composición farmacéutica objeto será adecuada para la administración a un sujeto, por ejemplo, será estéril. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica objeto será adecuada para la administración a un sujeto humano, por ejemplo, donde la composición es estéril y está libre de pirógenos detectables y/u otras toxinas.

Las composiciones de proteínas pueden comprender otros componentes, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera, para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, clorhidrato, sales de sulfato, solvatos (por ejemplo, sales iónicas mixtas, agua, productos orgánicos), hidratos (por ejemplo, agua), y similares.

Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una solución acuosa, forma de polvo, gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas, suspensiones, aerosoles y similares. La composición puede formularse según las diversas vías de administración descritas a continuación.

Cuando un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra como un inyectable (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal y/o intravenosa) directamente en un tejido, se puede proporcionar una formulación como una forma de dosificación lista para usar, o como una forma no acuosa (por ejemplo, un polvo reconstituible estable al almacenamiento), o una forma acuosa, tal como un líquido compuesto por vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones que contienen proteínas también se pueden proporcionar para mejorar la semivida en suero de la proteína objeto después de la administración. Por ejemplo, la proteína se puede proporcionar en una formulación de liposoma, preparada como un coloide, u otras técnicas convencionales para extender la semivida en suero. Hay diversos métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka et al. 1980 *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467, Pat. de EE.UU. N.º 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. Las preparaciones

también se pueden proporcionar en forma de liberación controlada o de liberación lenta.

Otros ejemplos de formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección isotónicas estériles, antioxidantes, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Por ejemplo, una composición farmacéutica objetivo puede estar presente en un recipiente, por ejemplo, un recipiente estéril, tal como una jeringa. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada (secada por congelación) que requiere solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

La concentración de un polipéptido multimérico de la presente descripción en una formulación puede variar ampliamente (por ejemplo, de menos de aproximadamente el 0,1 %, usualmente de al menos aproximadamente el 2 % a tanto como del 20 % al 50 % o más en peso) y usualmente se seleccionarán principalmente en función de los volúmenes de fluido, las viscosidades y los factores basados en el paciente según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

La presente divulgación proporciona un recipiente que comprende una composición de la presente divulgación, por ejemplo, una composición líquida. El recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una ampolla y similares. En algunos casos, el contenedor es estéril. En algunos casos, tanto el recipiente como la composición son estériles.

Composiciones que comprenden un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante

La presente divulgación proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación. Se conoce una amplia diversidad de excipientes farmacéuticamente aceptables en la técnica y no es necesario analizarlos en detalle en el presente documento. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en diversas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds 7ª ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Una composición de la presente divulgación puede incluir: a) un ácido nucleico objeto o un vector de expresión recombinante; y b) uno o más de: un tampón, un tensioactivo, un antioxidante, un polímero hidrófilo, una dextrina, un agente quelante, un agente de suspensión, un solubilizante, un agente espesante, un estabilizador, un agente bacteriostático, un agente humectante, y un conservante. Los tampones adecuados incluyen, pero sin limitación, (tales como ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (BIS-Tris), ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-3-propanosulfónico (EPPS o HEPPS), glicilglicina, ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etano-sulfónico) (PIPES), bicarbonato de sodio, ácido 3-(N-tris(hidroximetil)-metil-amino)-2-hidroxi-propanosulfónico) TAPSO, ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES), N-tris(hidroximetil)metil-glicina (Tricina), tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), etc.). Las sales adecuadas incluyen, por ejemplo, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄, etc.

Una formulación farmacéutica de la presente divulgación puede incluir un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 90 % (p/p). En la descripción de las formulaciones, a continuación, se entenderá que "ácido nucleico objeto o vector de expresión recombinante" incluye un ácido nucleico o vector de expresión recombinante de la presente divulgación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una formulación objeto comprende un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación.

Un ácido nucleico objeto o vector de expresión de recombinante sujeto puede mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otros compuestos o mezclas de compuestos; dichos compuestos pueden incluir, por ejemplo, liposomas o moléculas dirigidas al receptor. Un ácido nucleico objeto o vector de expresión recombinante se puede combinar en una formulación con uno o más componentes que ayudan en la captación, distribución y/o absorción.

Un ácido nucleico objeto o vector de expresión recombinante puede formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Un ácido nucleico objeto o vector de expresión de recombinante también se puede formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Una formulación que comprende un ácido nucleico objeto o vector de expresión recombinante puede ser una

formulación liposomal. Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados
 5 pueden interactuar con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Pueden usarse liposomas tanto catiónicos como no catiónicos para administrar un ácido nucleico objeto o un vector de expresión recombinante.

10 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado una vida útil en circulación mejorada en relación con los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte
 15 de la porción de lípido que forma la vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de EE.UU. N.º 6.287.860,

Las formulaciones y composiciones de la presente divulgación también pueden incluir tensioactivos. El uso de
 20 tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de EE.UU. N.º 6.287.860.

En una realización, se incluyen diversos potenciadores de la penetración, para realizar la administración eficiente de ácidos nucleicos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los
 25 potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de EE.UU. N.º 6.287.860,

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas,
 30 nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes saporíferos, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispensación o aglutinantes. Las formulaciones orales adecuadas incluyen aquellas en las que se administra un ácido nucleico antisentido objeto junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y
 35 quelantes. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares y los ácidos grasos adecuados y sus usos se describen adicionalmente en la Pat. de EE.UU. N.º 6.287.860. También se adecuadas combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación adecuada a modo de ejemplo es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros
 40 potenciadores de la penetración incluyen, pero sin limitación, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter. Los potenciadores de la penetración adecuados también incluyen propilenglicol, dimetilsulfóxido, trietanolamina, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, 2-pirrolidona y derivados de los mismos, alcohol tetrahidrofurfúrico y AZONETM.

45 MÉTODOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE LOS LINFOCITOS T

También se proporciona un método para inhibir un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que
 comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de
 50 linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para inhibir un clon de linfocitos T.

También se proporciona un método para estimular un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico que
 comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de
 55 linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para estimular un clon de linfocitos T.

La presente divulgación proporciona un método para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico
 de epítipo, comprendiendo el método poner en contacto el linfocito T con un polipéptido multimérico de la presente divulgación, donde el contacto del linfocito T con un polipéptido multimérico de la presente divulgación modula
 60 selectivamente la actividad del linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el contacto tiene lugar *in vitro*. En algunos casos, el contacto tiene lugar *in vivo*. En algunos casos, el contacto tiene lugar *ex vivo*.

En algunos casos, por ejemplo, donde el linfocito T diana es un linfocito T CD8⁺, el polipéptido multimérico comprende
 polipéptidos MHC de Clase I (por ejemplo, cadena pesada de β 2-microglobulina y MHC de Clase I). En algunos casos, por ejemplo, donde el linfocito T diana es un linfocito T CD4⁺, el polipéptido multimérico comprende polipéptidos MHC
 65 de Clase II (por ejemplo, cadena α MHC de Clase II; cadena β MHC de Clase II).

Cuando un polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye un polipéptido inmunomodulador que es un polipéptido activador, el contacto del linfocito T con el polipéptido multimérico activa el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula cancerosa, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta la actividad citotóxica del linfocito T hacia la célula cancerosa. En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula cancerosa, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta el número de los linfocitos T específicos de epítipo.

En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula infectada por virus, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta la actividad citotóxica del linfocito T hacia la célula infectada por virus. En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula infectada por virus, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta el número de linfocitos T específicos de epítipo.

Cuando polipéptido multimérico de la presente divulgación incluye un polipéptido inmunomodulador que es un polipéptido inhibidor, el contacto del linfocito T con el multimérico inhibe el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T autorreactivo que es específico para un epítipo presente en un autoantígeno, y el contacto reduce el número de linfocitos T autorreactivos.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

También se proporciona un método para tratar un trastorno autoinmune inhibiendo un clon de linfocitos T autorreactivo que reconoce un epítipo peptídico que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio inhibidor, en una cantidad eficaz para tratar un trastorno autoinmune.

También se proporciona un método para tratar un cáncer estimulando un clon de linfocitos T que reconoce un epítipo peptídico en un cáncer que comprende poner en contacto un linfocito T del clon con un péptido recombinante como se describe en el presente documento, donde el péptido recombinante comprende el epítipo peptídico y comprende un dominio modulador de linfocitos T que es un dominio estimulador, en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

En una realización, las células transformadas para expresar un polipéptido recombinante de la invención son células aisladas adaptadas a la suspensión. En una realización de la pluralidad de dichas células aisladas adaptadas a la suspensión, o del ácido nucleico recombinante, el ácido nucleico comprende ADN.

En una realización, los linfocitos T comprenden linfocitos T periféricos obtenidos de un sujeto. En una realización, los linfocitos T comprenden linfocitos T en un sujeto. En una realización, los linfocitos T comprenden linfocitos T periféricos en un sujeto. En una realización de los métodos en el presente documento, el sujeto es humano.

La presente divulgación proporciona un método para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad del polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido multimérico, eficaz para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo en un individuo. En algunos casos, un método de tratamiento de la presente divulgación comprende administrar a un individuo que lo necesite uno o más vectores de expresión recombinante que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, un método de tratamiento de la presente divulgación comprende administrar a un individuo que lo necesite una o más moléculas de ARNm que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico de la presente divulgación. En algunos casos, un método de tratamiento de la presente divulgación comprende administrar a un individuo que lo necesite un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona un método para modular selectivamente la actividad de un linfocito T específico de epítipo en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de expresión; ARNm; etc.) que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico modula selectivamente la actividad del linfocito T específico de epítipo en el individuo. La modulación selectiva de la actividad de un linfocito T específico de epítipo puede tratar una enfermedad o trastorno en el individuo. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación.

En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido activador, y el polipéptido multimérico activa el linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el epítipo es un epítipo asociado al cáncer, y el polipéptido multimérico aumenta la actividad de un linfocito T específico para el epítipo asociado al cáncer.

La presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de expresión; ARNm; etc.) que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico comprende un epítipo de linfocitos T que es un epítipo de cáncer, y donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido inmunomodulador estimulador. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células de cáncer en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células cancerosas en el individuo en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, en comparación con el número de células cancerosas en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células cancerosas en el individuo a niveles indetectables. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la masa tumoral en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la masa tumoral en el individuo en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, en comparación con la masa tumoral en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, aumenta el tiempo de supervivencia del individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, aumenta el tiempo de supervivencia del individuo en al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, de 3 meses a 6 meses, de 6 meses a 1 año, de 1 año a 2 años, de 2 años a 5 años, de 5 años a 10 años, o más de 10 años, en comparación con el tiempo de supervivencia del individuo en ausencia de administración con el polipéptido multimérico.

En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula infectada por virus, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta la actividad citotóxica del linfocito T hacia la célula infectada por virus. En algunos casos, el linfocito T específico de epítipo es un linfocito T que es específico para un epítipo presente en una célula infectada por virus, y el contacto del linfocito T específico de epítipo con el polipéptido multimérico aumenta el número de linfocitos T específicos de epítipo.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una infección por virus en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico comprende un epítipo de linfocitos T que es un epítipo viral, y donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido inmunomodulador estimulador. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células infectadas por virus en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células infectadas por virus en el individuo en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, en comparación con el número de células infectadas por virus en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células infectadas por virus en el individuo a niveles indetectables.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una infección en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico comprende un epítipo de linfocitos T que es un epítipo asociado a patógeno, y donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido inmunomodulador estimulador. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de patógenos en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de patógenos en el individuo en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, en comparación con el número de patógenos en el

individuo antes de la administración del polipéptido multimérico, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de patógenos en el individuo a niveles indetectables. Los patógenos incluyen virus, bacterias, protozoos y similares.

En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido inhibidor, y el polipéptido multimérico inhibe la actividad del linfocito T específico de epítipo. En algunos casos, el epítipo es un autoepítipo, y el polipéptido multimérico inhibe selectivamente la actividad de un linfocito T específico para el autoepítipo.

La presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno autoinmune en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico comprende un epítipo de linfocitos T que es un autoepítipo, y donde el polipéptido multimérico comprende un péptido inmunomodulador inhibidor. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de linfocitos T autorreactivos en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, en comparación con el número de linfocitos T autorreactivos en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la producción de citocinas Th2 en el individuo. En algunos casos, una "cantidad eficaz" de un polipéptido multimérico es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, mejora uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune en el individuo.

Como se ha apreciado anteriormente, en algunos casos, en la realización de un método de tratamiento en el sujeto, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra a un individuo que lo necesite, como el polipéptido *per se*. En otros casos, en la realización de un método de tratamiento en el sujeto, uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administran a un individuo que lo necesite. Por lo tanto, en otros casos, uno o más ácidos nucleicos de la presente divulgación, por ejemplo, uno o más vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación, se administran a un individuo que lo necesite.

Formulaciones

Las formulaciones adecuadas se han descrito anteriormente, donde las formulaciones adecuadas incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una formulación adecuada comprende: a) un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una formulación adecuada comprende: a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; en algunos casos, el ácido nucleico es un ARNm. En algunos casos, una formulación adecuada comprende: a) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; b) un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una formulación adecuada comprende: a) un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una formulación adecuada comprende: a) un primer vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; b) un segundo vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente divulgación; y c) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se han descrito anteriormente.

Dosificaciones

Una dosificación adecuada puede determinarse por un médico tratante u otro personal médico calificado, basándose en diversos factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el polipéptido o ácido nucleico particular a administrar, sexo del paciente, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos administrados simultáneamente. Un polipéptido multimérico de la presente divulgación puede administrarse en cantidades entre 1 ng/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, se contemplan dosis por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Si el régimen es una infusión continua, también puede estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

En algunos casos, una dosis adecuada de un polipéptido multimérico de la presente divulgación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal, o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del agente administrado en los fluidos o tejidos corporales. Después del éxito del tratamiento, puede ser deseable que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para evitar la reaparición de la patología, donde un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal, o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal.

Los expertos en la técnica apreciarán que los niveles de las dosis pueden variar en función del polipéptido multimérico específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del paciente a los efectos secundarios. Las dosis preferidas para un determinado compuesto pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica mediante diversos medios.

En algunas realizaciones, se administran dosis múltiples de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación. La frecuencia de administración de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación puede variar dependiendo de cualquiera de diversos factores, por ejemplo, gravedad de los síntomas, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tiw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, cada dos días (qod), diariamente (qd), dos veces al día (qid), o tres veces al día (tid).

La duración de administración de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación, por ejemplo, el periodo de tiempo durante el cual se administra un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación, puede variar, dependiendo de cualquiera de diversos factores, por ejemplo, respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación durante un periodo de tiempo que varía de aproximadamente un día a aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, de aproximadamente ocho meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 2 años, o de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años, o más.

Vías de administración

Un agente activo (un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación) se administra a un individuo usando cualquier método y ruta disponibles adecuados para la administración del fármaco, incluyendo métodos *in vivo* y *ex vivo*, así como vías de administración sistémicas y localizadas.

Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen la administración intratumoral, peritumoral, intramuscular, intratraqueal, intracraneal, subcutánea, intradérmica, aplicación tópica, intravenosa, intraarterial, rectal, nasal, oral y otras vías de administración enteral y parenteral. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del polipéptido multimérico y/o el efecto deseado. Un polipéptido multimérico de la presente divulgación, o un ácido nucleico o vector de expresión recombinante de la presente divulgación, puede administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis.

En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía intramuscular. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía local. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía intratumoral. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía peritumoral. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía intracranial. En algunas

realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación se administra por vía subcutánea.

En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía intramuscular. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía local. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía intratumoral. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía peritumoral. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico de la presente divulgación se administra por vía intracraneal. En algunas realizaciones, un polipéptido multimérico se administra por vía subcutánea.

Un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación puede administrarse a un huésped usando cualquier método convencional disponible y vías adecuadas para la administración de fármacos convencionales, incluyendo vías sistémica o localizada. En general, las vías de administración contempladas por la divulgación incluyen, pero sin limitación, vías enterales, parenterales o de inhalación.

Las vías de administración parenterales distintas de la administración por inhalación incluyen, pero sin limitación, vías tópicas, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, intratumoral, peritumoral e intravenosa, es decir, cualquier vía de administración distinta de a través del canal alimentario. La administración parenteral se puede llevar a cabo para realizar la administración sistémica o local de un polipéptido multimérico de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación, o un vector de expresión recombinante de la presente divulgación. Cuando se desea la administración sistémica, la administración típicamente implica la administración tópica o mucosa invasiva o absorbida sistémicamente de preparaciones farmacéuticas.

Sujetos adecuados para el tratamiento

Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente divulgación incluyen individuos que tienen cáncer, incluyendo individuos que han sido diagnosticados con cáncer, individuos que han sido tratados por cáncer pero que no respondieron al tratamiento, e individuos que han recibido tratamiento por cáncer y que respondieron inicialmente, pero después se volvieron refractarios al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente divulgación incluyen individuos que tienen una infección (por ejemplo, una infección con un patógeno tal como una bacteria, un virus, un protozoo, etc.), incluyendo individuos que han sido diagnosticados con una infección, e individuos que han sido tratados por una infección pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente divulgación incluyen individuos que tienen infección bacteriana, incluyendo individuos que han sido diagnosticados con una infección bacteriana, e individuos que han sido tratados por una infección bacteriana pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente divulgación incluyen individuos que tienen infección vírica, incluyendo individuos que han sido diagnosticados con una infección vírica, e individuos que han sido tratados por una infección vírica pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente divulgación incluyen individuos que tienen una enfermedad autoinmune, incluyendo los individuos que han sido diagnosticados con una enfermedad autoinmune, e individuos que han sido tratados por una enfermedad autoinmune pero que no respondieron al tratamiento.

Todas las combinaciones de los diversos elementos descritos en el presente documento están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

Esta invención se entenderá mejor a partir de los Detalles Experimentales, que se indican a continuación. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos analizados son meramente ilustrativos de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas sobre cómo preparar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius, y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Se pueden usar abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, par(es) de bases; kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s, segundo(s); min, minuto(s); h, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, pares de bases; nt, nucleótido(s); i.m., por vía intramuscular; i.p., por vía intraperitoneal; s.c., por vía subcutánea; y similares.

EJEMPLO 1: GENERACIÓN HETERODÍMEROS SYNTAC

Los aspectos de la presente divulgación pertenecen a una nueva plataforma terapéutica a base de proteínas, "synTac", que imita la especificidad de interacción y las señales reguladoras de la sinapsis inmunológica. SynTac es una proteína de fusión que une una molécula coestimuladora a un epítipo MHC que permite el acoplamiento preciso de los linfocitos T y la activación o inhibición clonal de los linfocitos T (figura 1), una versión soluble de la respuesta natural del cuerpo. De esta manera, synTac combina los mejores epítopos, anticuerpos biespecíficos, moléculas coestimuladoras solubles y ADC. SynTac permite el direccionamiento celular altamente específico a través del epítipo MHC, con un diseño de "fusión monocatenaria" que no permite la presentación cruzada del epítipo libre (figuras 2A-2C). Un dominio modulador de linfocitos T (como alternativa, descrito en el presente documento como "MOD") también está unido covalentemente, lo que provoca la activación o inhibición dependiendo de la naturaleza del acoplamiento coestimulador. Esto provoca una respuesta de linfocitos T específica de antígeno, no global. Notablemente, el MOD puede incluir cualquier anticuerpo conocido, fragmento de anticuerpo, molécula coestimuladora, u otra carga útil validada por la bibliografía (citocinas, toxinas, etc.), y no necesita internalizarse para ejercer un efecto sobre el linfocito T. Además, ambas dianas están presentes en la superficie de la misma célula, eliminando el "problema de espacio" de los anticuerpos biespecíficos tradicionales.

En un ejemplo, la estrategia explota una construcción de fusión Fc (un ejemplo no limitativo se expone en las Figuras 2A-2C) para aumentar la valencia, la estabilidad y la ventana terapéutica de los productos asociados. Brevemente, la región Fc es un homodímero covalente nativo y se estabiliza a través de dos enlaces disulfuro ilustrados como dos líneas finas en las figuras 2A-2C. Se sabe que la presencia del dominio Fc prolonga la actividad terapéutica al aumentar la semivida plasmática, debido a su interacción con el receptor Fc neonatal, así como a la depuración renal más lenta para moléculas bivalentes de mayor tamaño [23, 24]. Desde una perspectiva biofísica, el dominio Fc se pliega de forma independiente y puede mejorar la solubilidad y la estabilidad de la molécula asociada tanto *in vitro* como *in vivo* [25], y la región Fc permite una purificación fácil y rentable por cromatografía de afinidad de proteína A/G durante la producción [26]. La figura 2A muestra una proteína MHC peptídica monocatenaria (trímero monocatenario [27]) unida en su extremo carboxi a una región Fc de IgG. Como se muestra, estas construcciones monocatenarias están limitadas con respecto a la capacidad de extender el sistema a través de enlaces de proteínas alternativas (tal como el MOD). Específicamente, los enlaces están restringidos preferiblemente a una región C-terminal del MHC, representada por líneas discontinuas en la figura 2A (que en el presente documento se denomina enlace directo). Se pueden usar moléculas MHC I o MHC II. La expresión de construcciones que utilizan un enfoque de enlace directo depende en gran medida del MOD que se utilice. Una solución a esto, divulgada en el presente documento, es dividir la construcción en cadenas pesadas y ligeras respectivas y fusionar tanto los péptidos como las proteínas con diversos extremos (figura 2B y figura 2C). Una construcción da como resultado una asociación amino-terminal del péptido con la cadena ligera (beta 2 microglobulina) seguida de una extensión carboxilo terminal de la cadena ligera a la molécula efectora MOD (figura 2B). En este escenario, la cadena pesada (molécula HLA) se fusiona con la región Fc. Todos los componentes se asocian durante la producción dentro de las células eucariotas (por ejemplo, HEK, CHO) y se autoensamblan. Las construcciones se mantienen juntas covalentemente a través de puentes disulfuro. Una orientación alternativa (figura 2C) coloca el extremo amino terminal MOD de la cadena pesada fusionada al Fc con el péptido aún unido a la cadena ligera de B2M. De nuevo, todos los componentes se autoensamblan y forman interacciones covalentes estables a través de enlaces disulfuro. Los anticuerpos biespecíficos tradicionales a menudo intentan puentear dos células dimerizando una carga útil Fc amino terminal con una carga útil Fc carboxilo terminal. Por el contrario, una construcción divulgada en el presente documento orienta dos cargas útiles de proteínas diferentes, un mecanismo de direccionamiento del epítipo MHC y un efector MOD, a la superficie de la misma célula, similar a una interacción de cadena ligera CH1 encontrada dentro de los anticuerpos tradicionales. Además, el uso de fusiones Fc permite el acoplamiento personalizado de funciones efectoras asociadas, tal como la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la fagocitosis, mediante la modulación de las afinidades de unión a los receptores Fc a través de mutaciones [28].

Se presenta un diseño para dos moléculas base synTac en la figura 3A-3B. Brevemente, esta construcción utiliza una secuencia líder de B2M humana nativa para permitir la secreción eficiente y el procesamiento ER inmediatamente seguido de un epítipo candidato (etiquetado como péptido). Una vez en el ER, la secuencia líder se elimina por completo y permite la presentación del péptido en el bolsillo de unión a MHC. Para un enlace de "cadena ligera" (LC, figura 3A), esto se acopla a la molécula B2M nativa a través del enlazador L1 y al MOD a través del enlazador L2. Todo este casete está unido a otra secuencia líder de B2M, la cadena pesada MHC (por ejemplo, HLA-A02:01 humano o H-2Kd murino en los ejemplos), y un dominio Fc (IgG1 humano o IgG2a murino) por un péptido de "autoescisión" de teschovirus-1 porcino viral (P2A) para permitir la expresión estequiométrica de cada cadena. Se eligió el péptido P2A ya que tiene la mayor eficacia de "escisión" informada de todos los péptidos 2A virales expresados en células de mamífero [29]. El enlace de "cadena pesada" (HC, figura 3B) es similar, sin embargo, el péptido P2A viral ahora sigue a la B2M y el MOD sigue al segundo péptido líder, lo que conduce a la construcción proteica mostrada en la figura 2C. Ambas construcciones pueden terminar en una etiqueta 8x His para facilitar la purificación.

Células de expresión especializadas: Aunque ambas cadenas se expresan y se colocan en el ER, debido al enlace P2A, había cierta preocupación de que la B2M endógena del huésped de expresión (células HEK293 adaptadas a la suspensión) pudiera competir con la versión recombinante ya que las células HEK293 expresan de forma nativa las moléculas HLA y B2M. Esto daría como resultado una estabilidad disminuida (por ejemplo, que se manifiesta en rendimientos globales disminuidos) o una muestra de proteína heterogénea altamente indeseable. Para evitar esta

complicación, se aprovechó el sistema CRISPR/CAS para desactivar la B2M nativa del grupo de células HEK [30]. Brevemente, el ARN guía se diseñó contra B2M endógeno, se transfectó junto con un plásmido que codifica CRISPR/CAS y se dejó cultivar durante tres días. Las células cultivadas se tiñeron en la superficie contra anti-B2M y se contraseleccionaron (clasificadas por pérdida de fluorescencia) mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se permitió que las células clasificadas se recuperaran y se sometieran a dos rondas más de tinción, contraclasificación y recuperación (3 rondas en total) para garantizar una eliminación eficaz (~100 %). Como se ilustra en la figura 4, se comprobó la calidad del grupo final mediante el control de la expresión superficial de B2M a través de FACS, lo que sugiere la eliminación completa de la proteína B2M endógena. Después, se realizan experimentos que aprovechan la secuenciación de la próxima generación para cuantificar los porcentajes de desactivación a nivel genómico. La línea HEK-293-B2M-KO resultante (denominada HEK-KO) se usó para todos los experimentos posteriores.

Enlaces disulfuro diseñados: Para aumentar la estabilidad proteica y evitar las complicaciones asociadas con la posible transferencia de péptidos a las moléculas MHC celulares (presentación cruzada) y la liberación de B2M, generalmente se emplean construcciones monocatenarias [27, 31]. Sin embargo, estas construcciones monocatenarias (mostradas en la figura 2A) están limitadas con respecto a la capacidad de extender el sistema a través de enlaces de proteínas alternativas (tal como el MOD). Una solución es dividir la construcción en las respectivas cadenas pesadas y ligeras de forma análoga a los esfuerzos anteriores [32], pero ahora fusiona tanto los péptidos como las proteínas en diversos extremos como se describe (figura 2B y 2C). Sin embargo, en la construcción final, para consertar la estabilidad proporcionada por los sistemas tradicionales monocatenarios, se investigó la opción de diseñar puentes de disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras (que se ilustra como S-S en la figura 2), como se ve en los trímeros monocatenarios atrapados con disulfuro [dt-SCT] [33]. En particular, dado que los intentos iniciales de producción de synTac que utilizan el esquema de disulfuro de dt-SCT dieron como resultado bajos niveles de expresión, y esto depende adicionalmente del péptido que se presenta, la configuración de disulfuro de dt-SCT se consideró no ideal para su uso en sistemas de proteínas divididas. Por lo tanto, se buscó identificar posiciones alternativas para diseñar puentes disulfuro más adecuados para sistemas de proteínas divididas, tal como synTac. Se eligieron dos posiciones de la cadena ligera (2, 12), cada una con un potencial de enlace disulfuro para dos posiciones en la cadena pesada (119, 120 y 236, 237 respectivamente, del análisis de PDB 2X4R). En particular, estas posiciones son residuos altamente conservados que no se sabe que interactúan con el surco de unión al péptido [34], el complejo TCR [35] o el correceptor CD8 [36]. Se demostró una expresión de alto nivel para una construcción (H236-L12, haciendo referencia H a la posición de cadena pesada y haciendo referencia L a la ligera, marcada como synTac 18 en la figura 5A-5B) con expresión modesta para una segunda (H237-L12, synTac 17 figura 5A-5B). El esquema de disulfuro de dt-SCT se utilizó como control positivo (marcado como synTac 2). Se formó un resto de alto peso molecular como se ve por geles PAGE no reductores que sugieren la formación de enlaces disulfuro estables (figura 5A). Todas las construcciones de expresión se ampliaron a la escala de 100 ml, se purificaron y se probó la actividad a través de la unión de TCR afin expresado sobre la superficie de las células HEK (denominadas HEK-A6), como se controló por fluorescencia FACS, lo que sugiere un plegamiento y actividad adecuados (figura 5B). Las células que expresan TCR no afines (denominadas HEK-AS01) se usaron como control negativo. Se han generado construcciones adicionales con solo una etiqueta 8X His C-terminal (monovalente).

Controles synTac: El trabajo previo se ha centrado en la diabetes autoinmune [37], y se ha utilizado un sistema modelo relevante para la enfermedad, específicamente linfocitos T CD8+ 8.3 autorreactivas aisladas de los islotes pancreáticos de un ratón diabético no obeso (NOD). Sobre la base de este trabajo, se generaron construcciones synTac con un péptido compuesto por los residuos 206 a 214 de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP206-214) presentada por el alelo murino de clase I H-2Kd (denominado IGRP) que se sabe que interactúa con los linfocitos T 8.3. Se preparó un synTac de control que presentaba el péptido derivado del tumor (KYQAVTTTL, SEQ ID NO:18), que no es reconocido por los linfocitos T 8.3, de manera idéntica (por ejemplo, presentación murina H-2Kd) y designado TUM. Para determinar el grado al que el sistema puede tolerar múltiples alelos HLA (por ejemplo, H2-Kd murino, HLA-A02 humano, etc.), se construyó una tercera variante synTac que portaba un epítipo restringido HLA-A02 humano previamente validado (virus T-linfotrópico humano, Tax. 11-19) y denominada HTLV. Para permitir el agotamiento de linfocitos T dirigido, las construcciones synTac iniciales usaron un formato de enlace de cadena ligera y llevaron un dominio PD-L1 MOD (ilustrado esquemáticamente en la figura 2B). Cada variante synTac (IGRP, TUM y HTLV) mostró perfiles de expresión positivos en células HEK-KO, resultados de la página SDS no reductores mostrados en la figura 6A. Para examinar la generalidad del sistema de expresión, se exploraron construcciones synTac a base de IGRP con dominios MOD variantes, incluyendo dos MOD para la estimulación de linfocitos T (es decir, Fv monocatenario anti-CD28 humanizado y el dominio extracelular del ligando TNF 4-1BBL), y otros dos MOD que permiten la inhibición de linfocitos T (un mutante de un solo punto de B7-1 [W88A], que se sabe que se une solo a CTLA4 [38] y una variante truncada de PD-L1 [dominio variable de Ig solamente]). Todas las construcciones se expresaron bien en células HEK-KO, figura 6B. La capacidad de expresar proteínas synTac que aprovechan un formato de enlace de cadena pesada se exploró adicionalmente (ilustrado esquemáticamente en la figura 2C). Para esto, se utilizó un epítipo IGRP como péptido de direccionamiento y PD-L1 o scFv anti CD28 humanizado como MOD, mostrando de nuevo perfiles de expresión positivos en células HEK-KO (figura 6C). Posteriormente, se produjeron a una escala de 1L o más y se purificaron hasta homogeneidad a través de tanto Ni²⁺ IMAC y exclusión por tamaño en un entorno libre de endotoxinas. Todas las construcciones IGRP y TUM se utilizaron en ensayos de proliferación de linfocitos T y construcciones HTLV para los experimentos de puenteo de TCR-synTac-PD1 a continuación.

Puenteo de TCR-synTac-PD1. Si bien el perfil de la solución después de la exclusión por tamaño es indicativo de una proteína bien plegada, es deseable validar la integridad de cada componente synTac (tanto el mecanismo de direccionamiento del epítipo MHC como el MOD) antes de emplear estos reactivos en ensayos de actividad. Las células HEK-A6 descritas previamente se usaron como control positivo y las células que expresan un TCR no afín (AS01, sensible a un epítipo del virus Epstein-Bar restringido a HLA-A0201) se generaron y se usaron como control negativo junto con células precursoras no transducidas, denominadas HEK-AS01 y PARENTAL, respectivamente. La expresión de TCR se confirmó mediante fluorescencia de mCerulean (indicador de fusión de TCR) y tinción de superficie para el complejo de señalización de TCR (proxy de expresión de CD3ε). Las células HEK-A6 se expusieron a variantes synTac HTLV-PD-L1 purificadas no fluorescentes y se incubaron con su receptor afín PD1 fusionado a IgG2a murina. La fusión PD-1-Fc se detectó usando un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC. La fluorescencia de FITC (es decir, "puenteo") dependía de la expresión de superficie de TCR afín como se muestra en las figuras 7A-7B. En particular, no se observó fluorescencia de FITC cuando se expuso contra células HEK portadoras de TCR no afines o células parentales (HEK-AS01, PARENTAL), cuando se expuso contra FITC-PD1-Fc solamente o cuando el MOD estaba ausente.

SynTac en acción: Ensayos de linfocitos T. Como prueba de concepto del poder de direccionamiento de la plataforma synTac, se probó una construcción inhibidora synTac en un ensayo de supresión de linfocitos T. Se planteó la hipótesis de que una versión de cadena ligera de synTac IGRP fusionada con PD-L1 suprimiría específicamente los linfocitos T específicos de IGRP206-214. Los esplenocitos CD8⁺ se purificaron a partir de un ratón diabético no obeso transgénico para el receptor de linfocitos T 8.3. Este subconjunto de esplenocitos contiene principalmente linfocitos T CD8⁺ que son específicos para el péptido IGRP206-214 en el contexto de H-2Kd. Estos linfocitos T CD8⁺ se cultivaron entonces en presencia de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado, un tratamiento conocido por estimular la activación de linfocitos T policlonales, y cultivos estimulados tratados con versiones solubles de synTac IGRP-PD-L1 o synTac TUM-PD-L1 para examinar la especificidad antigénica de cualquier efecto supresor. Una versión de synTac IGRP sin PD-L1 sirvió como control efector para el dominio MOD. Antes de la siembra, las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), un colorante citosólico fluorescente cuya intensidad se reduce a la mitad con cada división celular, con el fin de controlar el grado de proliferación celular inducida por la activación de los linfocitos T. Después de un periodo de cultivo de 5 días, las células se cosecharon y se examinaron usando citometría de flujo para determinar su viabilidad y proliferación. Los sobrenadantes también se examinaron para la expresión de las citocinas efectoras de linfocitos T CD8⁺ IFNγ y TNFα utilizando un ensayo de perlas citométricas de flujo multiplexado. Todos los parámetros de activación de linfocitos T CD8⁺ examinados se suprimieron de una manera específica del antígeno y dependiente del dominio efector (es decir, MOD), que se muestra en la figura 8A-8D. Es decir, IGRP-PD-L1 synTac era altamente supresor con respecto a TUM-PD-L1 synTac o IGRP-(sin PD-L1), lo que indica que la actividad de synTac dependía tanto de los dominios péptido-MHC como MOD (figura 8D). SynTac pudo suprimir la secreción de IFNγ en aproximadamente 100 veces y dio como resultado la muerte de la gran mayoría de las células, lo que sugiere que synTac con PDL1 como dominio MOD es capaz de suprimir funcionalmente, así como eliminar especificidades dirigidas.

Atenuación de la afinidad. Un posible problema con el uso del sistema PD-1/PDL-1 como dominio de modulación es que PD-L1 tiene el potencial de unirse a más de un receptor, con diferencias concomitantes en la señalización aguas abajo. Se ha demostrado que PD-L1 se une a B7-1 y PD-1. Para evitar la complicación de la unión inespecífica, se pueden usar mutantes de un solo punto que se unen solo a la diana deseada, PD-1 (por ejemplo, específicamente G119D y G119R, y otros como se analiza en el presente documento) conservando al mismo tiempo su potencial inhibidor de linfocitos T cuando se prueban como fusiones Fc independientes. En particular, las fusiones Fc mutantes de PD-L1 en solitario pueden ser reactivos útiles para la inmunomodulación. En el contexto de synTac, estos mutantes ofrecen una gama de afinidades de unión a PD-1. Se han producido proteínas de fusión synTac basadas en IGRP que portan los mutantes G119D y G119R.

Diseño modular: Las moléculas MHC monovalentes solubles tienen una afinidad intrínsecamente baja por sus receptores de linfocitos T afines y, por lo tanto, no han sido reactivos útiles para fines de diagnóstico o terapéuticos. Si bien los complejos MHC diméricos se han utilizado en diversos sistemas para visualizar linfocitos T específicos de antígeno [39], los tetrámeros MHC de mayor avidéz y los multímeros de orden superior se usan más comúnmente [40]. Resulta evidente a partir del presente trabajo que la construcción synTac dimérica actual proporciona una expresión de alto nivel de proteínas bien plegadas y provoca respuestas de linfocitos T dirigidas, sin embargo, en casos seleccionados puede ser conveniente extender la tecnología synTac aumentando la valencia para mejorar el potencial de direccionamiento de linfocitos T. Con ese fin, las variantes synTac se diseñaron de nuevo con un mecanismo de direccionamiento IGRP, con el PD-L1 MOD como un enlace de cadena ligera en el contexto de una región Fc de IgA e IgM. A través de la asociación covalente con la cadena J a través de puentes disulfuro, el esqueleto de IgA e IgM permite la presentación basada en tetrámero y decámero, respectivamente. Se generó lentivirus, se transdujeron células HEK-KO y se probó la expresión, lo que respalda una capacidad inicial de expresar estos reactivos. Si se desea, se puede unir el MOD directamente a la cadena J, como una fusión N-terminal, C-terminal o dual para cambiar la valencia de MOD a la molécula de direccionamiento. Además, debido a la flexibilidad de la configuración synTac, se pueden presentar múltiples epítopos peptídicos o MOD simultáneamente (por ejemplo, trispecificidad) mediante el uso de un enlace dual de cadena pesada/cadena ligera. Además, otros MOD incluyen, pero sin limitación, 4-1BBL y anti-CD28 para la activación y B7W para la inhibición. Las construcciones seleccionadas pueden aprovechar epítopos

de direccionamiento adicionales. Además, se pueden usar variantes synTac con niveles más altos de valencia (IgA e IgM), así como MOD unidos no estequiométricamente (por ejemplo, enlaces de cadena J) como se describe.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS SYNTAC TRIMÉRICOS

Expresión trimérica del receptor estimulador MOD (4-1BBL): Los esfuerzos iniciales para generar synTacs con 4-1BBL aprovecharon la variante de enlace de cadena ligera (figura 3A). Esto se expresó como una transfección única (todas las piezas codificadas en un solo plásmido), dividida por una secuencia viral P2A y dio como resultado una proteína bien plegada altamente expresada (figura 6B, carril 5). Los perfiles de filtración en gel junto con los datos de dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS) sugirieron que la versión inicial es un dímero bien plegado (como se ilustra en la figura 10B, figura 9B). Se ha observado que 4-1BBL, un ligando de la familia TNF, requiere trimerización (por ejemplo, tres copias de la misma proteína, homo-trímero) para determinar la actividad completa. Para lograr la trimerización, la construcción synTac con 4-1BBL junto con 4-1BBL "libre" (4-1BBL solo que no tiene etiqueta de afinidad [residuos 50-254, incluyendo los dominios de homología proximal de membrana y TNF, figura 10A; figura 9A]) se expresaron ambos en la misma célula (por ejemplo, coexpresión) para permitir el ensamblaje nativo y la trimerización, como se ilustra en la figura 10C (construcción synTac original en NEGRO, BBL libre en GRIS) (coexpresión de las construcciones de la figura 9A y la figura 9B). La cromatografía de filtración en gel junto con los datos de dispersión de luz multiángulo (MALS) respalda que la nueva versión es el trímero deseado (figuras 11A-11B, etiquetado como synTac número 40 + 51). Como se describe a continuación (*optimización de MOD*), las construcciones 4-1BBL pueden optimizarse adicionalmente para mejorar aún más los perfiles de expresión y purificación y aumentar la estabilidad y la reproducibilidad.

Unión al receptor estimulador MOD y reactividad cruzada humana/de ratón: Si bien el perfil de la solución después de la exclusión por tamaño es indicativo de una proteína bien plegada, es deseable validar la integridad de cada componente synTac (tanto el mecanismo de direccionamiento del epítipo MHC como el MOD) antes de emplear estos reactivos en ensayos de actividad. Este mecanismo de direccionamiento particular (péptido IGRP en el contexto de Kd murino) se ha validado a fondo (figura 7A-7B), por lo tanto, se investigó adicionalmente el grado de unión al receptor 4-1BBL. Con ese fin, las microperlas de proteína A se recubrieron hasta la saturación con proteína de fusión Fc 4-1BB-Fc recombinante humana o de ratón (de fuentes comerciales). Después, se usaron microperlas recubiertas con 4-1BB para unir construcciones synTac portadoras de ligando 4-1BB (versiones dimericas y triméricas) como dominio comodulador, seguido de un anticuerpo de detección fluorescente específico para el isotipo de cadena pesada synTac. El grado de unión específica de synTac 4-1BBL a 4-1BB transmitido por perlas se midió entonces mediante citometría de flujo de alto rendimiento. Usando este sistema, se exploró el grado de reactividad cruzada y las afinidades relativas de 4-1BBL tanto para 4-1BB humano como murino en el contexto del andamiaje synTac. Se demostró que los synTacs portadores de 4-1BBL (denominados Trímero, Dímero) se unen al receptor afín, pero no a microperlas unidas a Fc "sin receptor" (denominado sin MOD), lo que sugiere un reactivo de proteína bien plegado y activo (figura 12). Además, el trímero se unió en un rango de afinidad esperado para el acoplamiento trimérico dual con el dímero original, mostrando una reducción de 10 veces en la afinidad de unión, una vez más apoyando la presentación dimerica. Se usó synTac sin MOD (marcado como sin MOD) como control negativo, que no mostró unión para los receptores 4-1BBL. En particular, todas las construcciones se unen tanto a los receptores murinos como a los humanos (reacción cruzada) y, por lo tanto, permitirán la extensión directa a los ensayos murinos *in vivo*.

Ensayos de estimulación de linfocitos T *in vitro*: Para probar la actividad de los 4-1BBL synTacs, los esplenocitos CD8 se purificaron primero de ratones NOD transgénicos 8.3 TCR y se marcaron por fluorescencia con CFSE para rastrear la proliferación antes de tratarse *in vitro* con cualquier IGRP-41BBL synTac soluble (dímero y trímero) o TUM-41BBL synTac soluble (figura 13). Los tratamientos de control fueron medios en solitario o anti-CD3 inmovilizado. Después de 4 días en cultivo, las células se examinaron por FACS para determinar su viabilidad (exclusión de DAPI) y proliferación (dilución de CFSE). Los sobrenadantes se examinaron para determinar los niveles de IFN γ y TNF α mediante un ELISA de citometría de flujo. Como en el caso de syntac-PDL1 (figuras 8A-8D), la actividad *in vitro* de syntac-41BBL fue altamente específica de antígeno, lo que dio como resultado una viabilidad, proliferación y liberación de citocinas mucho mayor en el caso de syntac IGRP-41BBL frente a TUM-41BBL. Como se esperaba, 4-1BBL trimérico era necesario para la actividad completa (por ejemplo, proliferación, viabilidad y liberación de citocinas). Además, las respuestas a IGRP-41BBL se compararon favorablemente con el punto de referencia anti-CD3 inmovilizado, lo que sugiere que syntac-41BBL soluble puede mediar altos niveles de activación de linfocitos T. Todos los experimentos relacionados adicionales descritos en el presente documento utilizaron syntac-41BBL trimérico.

Estimulación de linfocitos T *in vivo* - dosis única: Se examinó adicionalmente si synTac-41BBL podría ejercer efectos similares sobre la activación de linfocitos T *in vivo*. Los ratones NOD se trataron con synTac IGRP-41BBL frente a synTac TUM-41BBL y se determinaron las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP en el bazo. A diferencia de los ratones NOD transgénicos TCR, en los que la mayor parte de los linfocitos T son de un clonotipo definido, los ratones NOD estándar tienen repertorios TCR muy diversos y son una mejor aproximación de un repertorio inmune "natural". Los ratones NOD se inyectaron por vía intraperitoneal con synTac IGRP-41 BBL, synTac TUM-41BBL o PBS y se sacrificaron 6 días después de la inyección. Después, los esplenocitos se examinaron mediante citometría de flujo para determinar las frecuencias relativas de linfocitos T CD8 específicos de IGRP usando una tinción de pentámero de péptido-MHC apropiada. El tratamiento con IGRP-41BBL se asoció con una frecuencia mucho mayor de linfocitos T CD8 específicos de IGRP frente a los controles. Además, las células específicas de IGRP

expandidas *in-vivo* fueron capaces de producir IFN γ cuando se reestimularon *in vitro*. Estos resultados apoyan la capacidad de syntac-41BBL de expandir los linfocitos T efectores CD8 funcionales de una manera específica de antígeno (figura 14).

- 5 *Estimulación de linfocitos T in vivo - dosis múltiple:* Se examinó el efecto del régimen de tratamiento alterado sobre la activación de linfocitos T in vivo, con especial atención a un antígeno tumoral establecido, el péptido noánmero "TUM". Los ratones NOD se trataron con synTac IGRP-41BBL frente a synTac TUM-41BBL usando tres dosis (en comparación con la dosis única anterior) durante un periodo de dos semanas. Se determinaron las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de IGRP o TUM. Los ratones NOD se inyectaron por vía intraperitoneal con synTac
- 10 IGRP-41BBL, synTac TUM-41BBL o PBS y se sacrificaron 7 días después de la inyección. La sangre (PBMC) y los esplénocitos se examinaron entonces a través de citometría de flujo para determinar las frecuencias relativas de linfocitos T CD8 específicos de IGRP o TUM usando una tinción de pentámero de péptido-MHC apropiada. De nuevo, el tratamiento con IGRP-41BBL se asoció con una frecuencia mucho mayor de linfocitos T CD8 específicos de IGRP, mientras que el tratamiento con TUM-41BBL se asoció con una frecuencia mucho mayor de linfocitos T CD8
- 15 específicos de TUM, frente a controles de antígeno y PBS irrelevantes (figura 15). Se observó un patrón similar en el bazo. Estos resultados apoyan la capacidad de un régimen multidosis de syntac-41BBL de expandir los linfocitos T efectores CD8 funcionales de una manera específica de antígeno, incluida la expansión específica de antígeno de linfocitos T específicos de tumor raro.
- 20 *Inhibición de linfocitos T in vivo.* Se inyectó por vía intraperitoneal a ratones diabéticos no obesos (NOD) synTac IGRP-PDL1, synTac TUM-PDL1 o PBS. Seis días después de la inyección, se disociaron los páncreas y se examinaron las células pancreáticas mediante citometría de flujo para determinar las frecuencias relativas de linfocitos T CD8⁺ específicos de IGRP, usando una tinción de pentámero de péptido-MHC apropiada. Como se muestra en la figura 23, el tratamiento con IGRP-PDL1 se asoció con una frecuencia mucho menor de linfocitos T CD8⁺ específicos
- 25 de IGRP, en comparación con los ratones tratados con synTac TUM-PDL1- y PBS de control. Estos datos demuestran un agotamiento *in vivo* específico de antígeno después de una dosis única de synTac.

Optimización de MOD: Durante el transcurso de la experimentación, se observó que la mayoría de la proteína diana (synTac trimérico 4-1BBL) presentaba características de multímeros de orden superior en la cromatografía de exclusión por tamaño y se degradaría con el tiempo, probablemente a través de la liberación/intercambio de BBL "libre". Por lo tanto, se buscó un esqueleto 4-1BBL con mayor estabilidad y facilidad de producción con énfasis en el ensamblaje covalente de 4-1BBL. Con ese fin, se exploró el uso de enlaces disulfuro diseñados dentro del dominio de homología TNF de 4-1BBL (figura 16A; disulfuros indicados con flechas; figura 9C-9E). A partir del análisis de la estructura de rayos X (PDB 2X29), se eligieron tres pares potenciales de residuos que probablemente tienen un potencial de enlace disulfuro y es poco probable que interfieran con la unión del receptor. Dos residuos nativos en cada construcción se reemplazaron por residuos de cisteína ((Q94C:P245C), Q94C:P242C, y Q89C:L115C, denominados synTac 69, 70 y 71 respectivamente), expresados en células humanas con una versión "libre" no etiquetada que alberga las mismas mutaciones (denominadas 98, 99, 100 respectivamente) para permitir el bloqueo covalente, y el grado de enlace disulfuro se observó mediante análisis SDS PAGE no reducido (figura 18; las siguientes construcciones de coexpresión se denominan DL1 (bloqueo disulfuro-1, synTac 69/98), DL2 (70/99) y DL3 (71/100)). Las tres construcciones también se expresaron, permitieron el bloqueo de disulfuro (figura 18) y se unieron al receptor (figura 17). Si bien estas variantes covalentes "bloqueadas por disulfuro" de synTac-4-1BBL abordan los problemas de estabilidad analizados, aún se requiere la coexpresión de BBL (coexpresión) "libre" para permitir la trimerización que puede complicar la producción y la biofabricación de synTacs estimuladores. Se encontró que una solución a este

45 obstáculo era la expresión del dominio de homología de TNF 4-1BBL como una construcción contigua única, denominada trímero monocatenario (4-1BBL-SCT, figura 16B; figura 9F). Específicamente, tres copias de residuos 4-1BBL 80-246 (dominio de homología de TNF solamente) se mantuvieron covalentemente por dos secuencias de enlazador (G4S)₅ (figura 16B, enlazadores ilustrados como líneas curvas; figura 9F). La expresión y la filtración en gel junto con los datos de dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS) respaldan que la nueva versión es el trímero covalente monocatenario deseado (figura 18) y se une bien al receptor 4-1BBL (figura 17).

50

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica deben entender que se pueden hacer diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición de la materia, proceso, etapa o etapas del proceso, al objetivo de la presente invención dentro del alcance según se define por la reivindicación adjunta.

55

Bibliografía

- 60 1. Kling, (2009) Nature Biotechnology, 2009. 27:11-12; 2. Wollheim (2002) Expert Opinion in Investigational Drugs, 11(7): 947-953.; 3. Mansh (2011) Yale J Biol Med, 84(4):381-389; 4. Scarpati et al (2014) OncoTargets and Therapy 7:203-209; 5. Rhodes (2007) Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 27(1): 19-30; 6. Amos et al. (2011) Blood. 118(3):499-509; 7. Hodi et al. (2010) New England Journal of Medicine. 363: p. 711-723; 8. Goldberg (2011) Cancer Immunology and Immunotherapy 344:269-278; 9. Kwon (2012) Molecular Cancer Therapeutics, 11:1062-1070; 10.
- 65 Vitale et al. (2012) Clinical Cancer Research 18(14):3812-3812; 11. Ngiew et al. (2011) Cancer Research, 71(10): 1-12; 12. Robins et al. (2010) Sci Transl Med, 2(47):47ra64; 13. Reichert (2011) MAbs, 2011. 3(5):415-416; 14. Weiner

- (2010) Nature Reviews Immunology 10:317-327; 15. Senter (2013) Annual Review of Medicine, 64:15-29; 16. Chames (2009) MAbs 1: 539-547; 17. Jakobsen (2013) OncoImmunology, 2(2):e22891; 18. Sharma, et al. (2014) Immunologic Research, 58(1): 132-138; 19. Wu et al. (2007) Nature Biotechnology, 25: 1290-1297; 20. Dimasi et al. (2009) Journal of Molecular Biology, 393(3):672-692; 21. Grupp, (2011) Cancer Immunology and Immunotherapy, 244:149-172; 22. Xu (2014) Cancer Letters, 343(2): 172- 178; 23. Suzuki et al. (2010) Journal of Immunology, 184(4): 1968-1976; 24. Sun (2014) Journal of Pharmaceutical Sciences 103(I):53-64; 25. Lo et al. (1998) Protein Engineering 11(6):495-500; 26. Flanagan et al. (2007) Methods in Molecular Biology 378:33-52; 27. Yu et al. (2002) Journal of Immunology 168(7):3145-4149; 28. Hezareh (2001) Journal of Virology 75(24): 12161 -12168; 29. Kim et al. (2011) PlosOne 6(4):el8556; 30. Yan et al (2014) Methods in Molecular Biology 1114:245-267; 31. Kim et al. (2010) Journal of Immunology 184:4423-4430; 32. Kozono et al. (1994) Nature 369:151-154; 33. Truscott et al. (2007) Journal of Immunology 178:6280-6289; 34. Kellenberger (2005) Journal of Immunology 175:3819-3825; 35. Marrack et al. (2008) Annual Reviews of Immunology 26:171-203; 36. Wang and Margulies (2009) Journal of Immunology 183(4):2554-2564; 37. Samanta et al. (2011). Proc Natl Acad Sci USA, 108(33): 13682-13687; 38. Zheng et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A, 95:6284-6289; 39. Schneek, J.P., Slansky, J., O'Herrin, S., Greten, T.F., *Use of MHC - Ig dimers for visualizing antigen specific T cells*. Current Protocol in Immunology, 1999: p. 173; 40. Altman, et al. (1996) Science, 274:94-96.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Albert Einstein College of Medicine, Inc.

<120> Polipéptidos Syntac y usos de los mismos

<130> JEC/FP7434640

<140> EP

<141> 15-06-2015

<150> EP 15809277.5

<151> 15-06-2015

<150> PCT/US2015/035777

<151> 15-06-2015

<150> US 62/013715

<151> 18-06-2014

<160> 102

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 3

Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 4
<211> 99
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 4

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15

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

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 5
<211> 276

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido sintético

<400> 5

Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly
1				5					10					15	

10

ES 2 770 330 T3

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

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

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro
275

<210> 6
<211> 925
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 6

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
20 25 30

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

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
50 55 60

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

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
100 105 110

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe
130 135 140

Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn
145 150 155 160

Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu Leu
165 170 175

Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln Phe
180 185 190

Val	Ala	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Pro	Gln	His	Ser	Asn	Phe	Arg	Gly	195	200	205	
Arg	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asn	Ala	Ala	Leu	210	215	220	
Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Cys	Cys	Ile	225	230	235	240
Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Val	Asn	245	250	255	
Ala	Pro	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Ser	Val	Asp	Pro	Ala	Thr	260	265	270	
Ser	Glu	His	Glu	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	275	280	285	
Val	Ile	Trp	Thr	Asn	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Val	Ser	Gly	Lys	Arg	Ser	290	295	300	
Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Glu	Gly	Met	Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Ser	305	310	315	320
Leu	Arg	Val	Asn	Ala	Thr	Ala	Asn	Asp	Val	Phe	Tyr	Cys	Thr	Phe	Trp	325	330	335	
Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Ile	Ile	Pro	Glu	340	345	350	
Leu	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Pro	Gln	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	355	360	365	
Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	370	375	380	
Gly	Pro	Met	Ser	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	385	390	395	400
Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	405	410	415	
Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	420	425	430	
Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	435	440	445	

Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
 450 455 460
 Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
 465 470 475 480
 Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
 485 490 495
 Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
 500 505 510
 Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
 515 520 525
 Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
 530 535 540
 Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
 565 570 575
 Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
 580 585 590
 Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
 595 600 605
 Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
 610 615 620
 Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
 625 630 635 640
 Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
 645 650 655
 Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
 660 665 670
 Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ala Ala Ala Gly Gly Asp
 675 680 685
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 690 695 700

ES 2 770 330 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 705 710 715 720
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 725 730 735
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 740 745 750
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 755 760 765
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 770 775 780
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 785 790 795 800
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 805 810 815
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 820 825 830
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 835 840 845
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 850 855 860
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 865 870 875 880
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 885 890 895
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 900 905 910
 Gly Lys Gly Gly Ser His His His His His His His
 915 920 925

<210> 7

<211> 945

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 7

```

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1      5      10      15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
20      25      30

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

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
50      55      60

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

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
85      90      95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
100     105     110

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115     120     125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130     135     140

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

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu
165     170     175

Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro
180     185     190

Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys
195     200     205

Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr
210     215     220

Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu
225     230     235     240

```

Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro
 245 250 255
 Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val
 260 265 270
 Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly
 275 280 285
 Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys
 290 295 300
 Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu
 305 310 315 320
 Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn
 325 330 335
 Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg
 340 345 350
 Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala
 355 360 365
 Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly
 370 375 380
 Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Asn Arg Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg
 420 425 430
 Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe
 435 440 445
 Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser
 450 455 460
 Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln
 465 470 475 480
 Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His

485								490				495			
Ser	Gln	Thr	His	Arg	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Cys	Tyr	Asn
			500					505					510		
Gln	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Val	Gln	Arg	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp
		515					520					525			
Val	Gly	Ser	Asp	Trp	Arg	Phe	Leu	Arg	Gly	Tyr	His	Gln	Tyr	Ala	Tyr
	530					535					540				
Asp	Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr
545					550					555					560
Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Lys	His	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala
				565					570					575	
His	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu
			580					585					590		
Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Thr
		595					600					605			
Asp	Ala	Pro	Lys	Thr	His	Met	Thr	His	His	Ala	Val	Ser	Asp	His	Glu
	610					615					620				
Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr
625					630					635					640
Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu
				645					650					655	
Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala
			660					665					670		
Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Gln
		675					680					685			
His	Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Trp	Glu	Pro	Ala	Ala
	690					695					700				
Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
705					710					715					720
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				725					730					735	

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
740 745 750

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
755 760 765

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
770 775 780

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
785 790 795 800

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
805 810 815

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
820 825 830

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
835 840 845

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
850 855 860

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
865 870 875 880

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
885 890 895

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
900 905 910

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
915 920 925

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser His His His His His His
930 935 940

His
945

<210> 8

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (1)..(5)
 5 <223> Repetir n veces donde n es un número entero de al menos 1
 <400> 8

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

10 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

20 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (1)..(4)
 <223> Repetir n veces donde n es un número entero de al menos 1
 <400> 9

25 Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 10
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

35 <400> 10

Gly Gly Ser Gly
 1

40 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 11

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

50 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 12

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 13

15

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

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

20

<220>
<223> Péptido sintético

25

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

30

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 15

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

40

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Péptido sintético

50

<400> 16

Gly Cys Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

55

<210> 17
<211> 9
<212> PRT

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
5	<400> 17	
		Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val 1 5
10	<210> 18	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 18	
		Lys Tyr Gln Ala Val Thr Thr Thr Leu 1 5
20		
	<210> 19	
	<211> 9	
	<212> PRT	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
30	<400> 19	
		Val Tyr Leu Lys Thr Asn Val Phe Leu 1 5
35	<210> 20	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Péptido sintético	
	<400> 20	
		Thr Tyr Leu Lys Thr Asn Leu Phe Leu 1 5
45		
	<210> 21	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<220>	
55	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(2)	
	<223> X puede ser L o Q	

<400> 21

Pro Xaa Gly Met Thr
1 5

5 <210> 22
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 22

Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr
50 55 60

Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr
65 70 75 80

Ala Gln Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln
85 90 95

Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg
130 135 140

15

Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn
165 170 175

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

Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu
210 215 220

Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 23

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 24

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

ES 2 770 330 T3

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 25
 10
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20
 <400> 26
 His His His His His
 1 5
 25
 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 27
 His His His His His His
 1 5
 35
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45
 <400> 28
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5
 50
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 29

ES 2 770 330 T3

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

5 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 30

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

15 <210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 31

25 **Phe His His Thr**
1

30 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 32

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ala

40 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

50 <220>
 <221> SITIO
 <222> (2)..(2)
 <223> X puede ser L o Q

<400> 33

ES 2 770 330 T3

Pro Xaa Gly Met Thr Ser
1 5

5 <210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 34

Glu Asn Leu Tyr Thr Gln Ser
1 5

15 <210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 35

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

25 <210> 36
<211> 4
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

35 <400> 36

Leu Val Pro Arg
1

40 <210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Péptido sintético

<400> 37

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

50 <210> 38
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 38

Cys Gly Leu Val Pro Ala Gly Ser Gly Pro
 1 5 10

10 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 39

Ser Leu Leu Lys Ser Arg Met Val Pro Asn Phe Asn
 1 5 10

20 <210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 40

Ser Leu Leu Ile Ala Arg Arg Met Pro Asn Phe Asn
 1 5 10

30 <210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 41

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

45 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 42

Ser Ser Tyr Leu Lys Ala Ser Asp Ala Pro Asp Asn
 1 5 10

55 <210> 43

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 43

 Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Asn
 1 5 10
 10
 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 44

 Ser Leu Arg Pro Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Asn
 1 5 10
 25
 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido sintético
 <400> 45

 Ser Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Asn Phe Asn
 1 5 10
 35
 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 46
 45
 Asp Val Asp Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Ser Phe Leu
 1 5 10
 50
 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 55
 <400> 47

ES 2 770 330 T3

Ser Leu Pro Leu Gly Leu Trp Ala Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 48

Ser Leu Leu Ile Phe Arg Ser Trp Ala Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 49

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

<210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 50

Ser Leu Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Phe Asn
1 5 10

<210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 51

Lys Lys Ser Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Ser Val
1 5 10

<210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 52

5

Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly
1 5 10

<210> 53

<211> 31

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 53

His Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met
1 5 10 15

Gly Arg Gly His Ala Arg Leu Val His Val Glu Glu Pro His Thr
20 25 30

20

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 54

Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val
1 5 10

30

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 55

Gly Gly Ser Gly Gln Arg Gly Arg Lys Ala Leu Glu
1 5 10

45

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<400> 56

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Phe Asn
1 5 10

5 <210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 57

Ser Leu Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Phe Asn
1 5 10

15 <210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 58

Ser Leu Leu Gly Ile Ala Val Pro Gly Asn Phe Asn
1 5 10

25 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético
 35 <400> 59

Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro
1 5 10

40 <210> 60
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 60

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

50 <210> 61
 <211> 18

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 61

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

Gly Pro

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 62

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 63
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 63

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 64

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 65
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 65

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

Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 66
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 66

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 67
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 67

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 68
<211> 20
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala
20

5

<210> 69

<211> 225

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 69

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
35 40 45

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
50 55 60

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
85 90 95

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
115 120 125

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
130 135 140

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

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
165 170 175

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
180 185 190

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
195 200 205

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
210 215 220

Glu
225

<210> 70

<211> 939

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 70

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ile Gln Lys
35 40 45

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

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
 305 310 315 320

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 325 330 335

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
 340 345 350

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
 355 360 365

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
 370 375 380

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg
 385 390 395 400

Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu
 405 410 415

Ala Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro
 420 425 430

Gly Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
 435 440 445

Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro
 450 455 460

Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln
 465 470 475 480

Thr Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg
 485 490 495

Thr Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe
 500 505 510

Gln Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg
 515 520 525

Gly Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
 530 535 540

Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr

545				550				555				560			
Arg	Arg	Lys	Trp	Glu 565	Gln	Ala	Gly	Asp	Ala 570	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Ala 575	Tyr
Leu	Glu	Gly	Glu 580	Cys	Val	Glu	Trp	Leu 585	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu 590	Leu	Gly
Asn	Glu	Thr 595	Leu	Leu	Arg	Thr	Asp 600	Ser	Pro	Lys	Ala	His 605	Val	Thr	Tyr
His	Pro 610	Arg	Ser	Gln	Val	Asp 615	Val	Thr	Leu	Arg	Cys 620	Trp	Ala	Leu	Gly
Phe 625	Tyr	Pro	Ala	Asp	Ile 630	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln 635	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp 640
Leu	Thr	Gln	Asp	Met 645	Glu	Leu	Val	Glu	Thr 650	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp 655	Gly
Thr	Phe	Gln	Lys 660	Trp	Ala	Ala	Val	Val 665	Val	Pro	Leu	Gly	Lys 670	Glu	Gln
Asn	Tyr	Thr 675	Cys	His	Val	His	His 680	Lys	Gly	Leu	Pro	Glu 685	Pro	Leu	Thr
Leu	Arg 690	Trp	Ala	Ala	Ala	Gly 695	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro 700	Thr	Ile	Lys	Pro
Cys 705	Pro	Pro	Cys	Lys 710	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu 715	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 720
Val	Phe	Ile	Phe	Pro 725	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp 730	Val	Leu	Met	Ile	Ser 735	Leu
Ser	Pro	Ile	Val 740	Thr	Cys	Val	Val	Val 745	Asp	Val	Ser	Glu	Asp 750	Asp	Pro
Asp	Val 755	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val 760	Asn	Asn	Val	Glu	Val 765	His	Thr	Ala
Gln	Thr 770	Gln	Thr	His	Arg	Glu 775	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr 780	Leu	Arg	Val	Val
Ser 785	Ala	Leu	Pro	Ile 790	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met 795	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe 800

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 805 810 815
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 820 825 830
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 835 840 845
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 850 855 860
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 865 870 875 880
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 885 890 895
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 900 905 910
 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 915 920 925
 Gly Gly Ser His His His His His His His His
 930 935

<210> 71

<211> 939

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 71

ES 2 770 330 T3

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ile Gln Lys
35 40 45

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

Pro Asn Ile Leu Asn Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile

ES 2 770 330 T3

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

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 325 330 335

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
 340 345 350

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Cys Ala Gly Leu
 355 360 365

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
 370 375 380

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg
 385 390 395 400

Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu
 405 410 415

Ala Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro
 420 425 430

Gly Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
 435 440 445

Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro
 450 455 460

Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln
 465 470 475 480

Thr Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg
 485 490 495

Thr Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe
 500 505 510

Gln Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg
 515 520 525

Gly Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
 530 535 540

Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr
 545 550 555 560

Arg Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr
 565 570 575

Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly
 580 585 590

Asn Glu Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr
 595 600 605

His Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly
 610 615 620

Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp
 625 630 635 640

Leu Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly
 645 650 655

Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln
 660 665 670

Asn Tyr Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr
 675 680 685

Leu Arg Trp Ala Ala Ala Gly Gly Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 690 695 700

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 705 710 715 720

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 725 730 735

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 740 745 750

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 755 760 765

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 770 775 780

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 785 790 795 800

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 805 810 815

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 820 825 830

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
835 840 845

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
850 855 860

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
865 870 875 880

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
885 890 895

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
900 905 910

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
915 920 925

Gly Gly Ser His His His His His His His His
930 935

<210> 72
<211> 225
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 72

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
35 40 45

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
50 55 60

Cys Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
85 90 95

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
115 120 125

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
130 135 140

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

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
165 170 175

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
180 185 190

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
195 200 205

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Cys Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
210 215 220

Glu
225

<210> 73

<211> 939

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 73

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ile Gln Lys
35 40 45

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

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

ES 2 770 330 T3

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
325 330 335

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
340 345 350

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Cys Glu Ile Pro Ala Gly Leu
355 360 365

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
370 375 380

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg
385 390 395 400

Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu
405 410 415

Ala Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro
420 425 430

Gly Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
435 440 445

Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro
450 455 460

Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln
465 470 475 480

Thr Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg
485 490 495

Thr Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe
500 505 510

Gln Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg
515 520 525

Gly Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
530 535 540

Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr
545 550 555 560

Arg Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr
565 570 575

Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly
 580 585 590

Asn Glu Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr
 595 600 605

His Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly
 610 615 620

Phe Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp
 625 630 635 640

Leu Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly
 645 650 655

Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln
 660 665 670

Asn Tyr Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr
 675 680 685

Leu Arg Trp Ala Ala Ala Gly Gly Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 690 695 700

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 705 710 715 720

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 725 730 735

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 740 745 750

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 755 760 765

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 770 775 780

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 785 790 795 800

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 805 810 815

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu

ES 2 770 330 T3

			820					825					830			
Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	
		835					840					845				
Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	
	850					855					860					
Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	
865					870					875					880	
Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	
				885					890					895		
Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	
			900					905					910			
Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys	
		915					920					925				
Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His	His					
	930						935									

<210> 74

<211> 225

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 74

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
35 40 45

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
50 55 60

Cys Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
85 90 95

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
115 120 125

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
130 135 140

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

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
165 170 175

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
180 185 190

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
195 200 205

Phe Arg Val Thr Cys Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
210 215 220

Glu
225

<210> 75
<211> 939

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido sintético

<400> 75

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ile Gln Lys
35 40 45

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

10

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

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
 325 330 335

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
 340 345 350

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Cys Ala Gly Leu
 355 360 365

Pro Ser Pro Arg Ser Glu Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
 370 375 380

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg
 385 390 395 400

Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu
 405 410 415

Ala Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro
 420 425 430

Gly Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
 435 440 445

Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro
 450 455 460

Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln
 465 470 475 480

Thr Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg
 485 490 495

Thr Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe
 500 505 510

Gln Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg
 515 520 525

Gly Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
 530 535 540

Glu Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr
 545 550 555 560

Arg Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr

565								570				575			
Leu	Glu	Gly	Glu	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Leu	Gly
580								585				590			
Asn	Glu	Thr	Leu	Leu	Arg	Thr	Asp	Ser	Pro	Lys	Ala	His	Val	Thr	Tyr
595								600				605			
His	Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Asp	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly
610								615				620			
Phe	Tyr	Pro	Ala	Asp	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp
625								630				635			
Leu	Thr	Gln	Asp	Met	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly
645								650				655			
Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Leu	Gly	Lys	Glu	Gln
660								665				670			
Asn	Tyr	Thr	Cys	His	Val	His	His	Lys	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr
675								680				685			
Leu	Arg	Trp	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro
690								695				700			
Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
705								710				715			
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu
725								730				735			
Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro
740								745				750			
Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
755								760				765			
Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val
770								775				780			
Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe
785								790				795			
Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr
805								810				815			

Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu
			820					825					830		
Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys
			835				840					845			
Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn
	850					855					860				
Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp
865					870					875					880
Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys
				885					890					895	
Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly
			900					905					910		
Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys
		915					920					925			
Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His					
	930						935								

<210> 76
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 76

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
35 40 45

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Cys Gly Met Phe Ala
50 55 60

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Pro Gly Cys Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
85 90 95

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
115 120 125

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
130 135 140

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

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
165 170 175

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
180 185 190

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
195 200 205

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Cys Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
210 215 220

Glu
225

<210> 77

<211> 1285
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 77

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

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

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ile Gln Lys
 35 40 45

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

10

ES 2 770 330 T3

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

305		310		315		320
Gly Ala Thr Val	Leu Gly Leu Phe Arg	Val Thr Pro Glu Ile	Pro Ala			
	325		330			335
Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly			
	340		345			350
Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser	Asp Pro Ala Gly	Leu Leu Asp			
	355		360			365
Leu Arg Gln Gly	Met Phe Ala Gln	Leu Val Ala Gln	Asn Val Leu Leu			
	370		375			380
Ile Asp Gly Pro	Leu Ser Trp Tyr	Ser Asp Pro Gly	Leu Ala Gly Val			
	385		390			395
Ser Leu Thr Gly	Gly Leu Ser Tyr	Lys Glu Asp Thr	Lys Glu Leu Val			
	405		410			415
Val Ala Lys Ala	Gly Val Tyr Tyr	Val Phe Phe Gln	Leu Glu Leu Arg			
	420		425			430
Arg Val Val Ala	Gly Glu Gly Ser	Gly Ser Val Ser	Leu Ala Leu His			
	435		440			445
Leu Gln Pro Leu	Arg Ser Ala Ala	Gly Ala Ala Ala	Leu Ala Leu Thr			
	450		455			460
Val Asp Leu Pro	Pro Ala Ser Ser	Glu Ala Arg Asn	Ser Ala Phe Gly			
	465		470			475
Phe Gln Gly Arg	Leu Leu His Leu	Ser Ala Gly Gln	Arg Leu Gly Val			
	485		490			495
His Leu His Thr	Glu Ala Arg Ala	Arg His Ala Trp	Gln Leu Thr Gln			
	500		505			510
Gly Ala Thr Val	Leu Gly Leu Phe	Arg Val Thr Pro	Glu Ile Pro Ala			
	515		520			525
Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly			
	530		535			540
Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser	Asp Pro Ala Gly	Leu Leu Asp			
	545		550			555
						560

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
 565 570 575

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
 580 585 590

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
 595 600 605

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
 610 615 620

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
 625 630 635 640

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
 645 650 655

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
 660 665 670

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
 675 680 685

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
 690 695 700

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
 705 710 715 720

Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp
 725 730 735

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val
 740 745 750

Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala Gly Pro His Ser Leu
 755 760 765

Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu Gly Glu Pro Arg
 770 775 780

Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp
 785 790 795 800

Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala Pro Trp Met Glu
 805 810 815

Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln Arg Ala Lys Ser
820 825 830

Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala Gln Arg Cys Tyr
835 840 845

Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg Met Phe Gly Cys
850 855 860

Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Gln Gln Phe Ala
865 870 875 880

Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Lys Thr Trp
885 890 895

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg Lys Trp Glu Gln
900 905 910

Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Cys Val
915 920 925

Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu Thr Leu Leu Arg
930 935 940

Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro Arg Ser Gln Val
945 950 955 960

Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Asp Ile
965 970 975

Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr Gln Asp Met Glu
980 985 990

Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala
995 1000 1005

Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr Thr Cys His
1010 1015 1020

Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg Trp Ala
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Gly Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro
1040 1045 1050

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1055 1060 1065

Ile Phe	Pro Pro	Lys Ile	Lys	Asp Val	Leu Met	Ile	Ser Leu	Ser
1070			1075			1080		
Pro Ile	Val Thr	Cys Val	Val	Val Asp	Val Ser	Glu	Asp Asp	Pro
1085			1090			1095		
Asp Val	Gln Ile	Ser Trp	Phe	Val Asn	Asn Val	Glu	Val His	Thr
1100			1105			1110		
Ala Gln	Thr Gln	Thr His	Arg	Glu Asp	Tyr Asn	Ser	Thr Leu	Arg
1115			1120			1125		
Val Val	Ser Ala	Leu Pro	Ile	Gln His	Gln Asp	Trp	Met Ser	Gly
1130			1135			1140		
Lys Glu	Phe Lys	Cys Lys	Val	Asn Asn	Lys Asp	Leu	Pro Ala	Pro
1145			1150			1155		
Ile Glu	Arg Thr	Ile Ser	Lys	Pro Lys	Gly Ser	Val	Arg Ala	Pro
1160			1165			1170		
Gln Val	Tyr Val	Leu Pro	Pro	Pro Glu	Glu Glu	Met	Thr Lys	Lys
1175			1180			1185		
Gln Val	Thr Leu	Thr Cys	Met	Val Thr	Asp Phe	Met	Pro Glu	Asp
1190			1195			1200		
Ile Tyr	Val Glu	Trp Thr	Asn	Asn Gly	Lys Thr	Glu	Leu Asn	Tyr
1205			1210			1215		
Lys Asn	Thr Glu	Pro Val	Leu	Asp Ser	Asp Gly	Ser	Tyr Phe	Met
1220			1225			1230		
Tyr Ser	Lys Leu	Arg Val	Glu	Lys Lys	Asn Trp	Val	Glu Arg	Asn
1235			1240			1245		
Ser Tyr	Ser Cys	Ser Val	Val	His Glu	Gly Leu	His	Asn His	His
1250			1255			1260		
Thr Thr	Lys Ser	Phe Ser	Arg	Thr Pro	Gly Lys	Gly	Gly Ser	His
1265			1270			1275		
His His	His His	His His	His					
1280			1285					

<210> 78
<211> 119

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

5

```

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1           5           10           15

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

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
      35           40           45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50           55           60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
      85           90           95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
      100           105           110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
      115

```

<210> 79
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

10

<400> 79

```

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1           5           10           15

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

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
      35           40           45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50           55           60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80

```

15

ES 2 770 330 T3

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 80

<211> 119

5 <212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 80

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Lys Met Gly Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Asn Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gly Pro Arg Thr
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

10

<210> 81

<211> 118

<212> PRT

15 <213> *Bos taurus*

<400> 81

Met Ala Arg Phe Val Ala Leu Val Leu Leu Gly Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Asp Ala Ile Gln Arg Pro Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Pro Glu Asp Gly Lys Pro Asn Tyr Leu Asn Cys Tyr Val Tyr
35 40 45

Gly Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Lys Ile Lys Ser Glu Gln Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser
65 70 75 80

Phe Tyr Leu Leu Ser His Ala Glu Phe Thr Pro Asn Ser Lys Asp Gln
85 90 95

Tyr Ser Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Glu Gln Pro Arg Ile Val
100 105 110

Lys Trp Asp Arg Asp Leu
115

<210> 82

<211> 119

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 82

Met Ala Arg Ser Val Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Val Ser Leu Thr
1 5 10 15

Gly Leu Tyr Ala Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn Cys Tyr Val Thr
35 40 45

Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu Lys Asn Gly Lys
50 55 60

Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

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

Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Ala Ser Met Ala Glu Pro Lys Thr
100 105 110

Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 83

<211> 227

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 84
<211> 325
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
1 5 10 15

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
35 40 45

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
85 90 95

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
100 105 110

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
130 135 140

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
145 150 155 160

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
165 170 175

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 195 200 205
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 210 215 220
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 225 230 235 240
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 245 250 255
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 260 265 270
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 275 280 285
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 290 295 300
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 85
 <211> 246
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
195 200 205

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 86
<211> 383
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 86

Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg His
1 5 10 15

Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly Tyr
20 25 30

His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser Gln
35 40 45

ES 2 770 330 T3

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

ES 2 770 330 T3

Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala
305 310 315 320

Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Arg Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp
325 330 335

Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr
340 345 350

Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser
355 360 365

Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys
370 375 380

<210> 87

<211> 276

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 87

Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glx Ser Asp Trp Leu Gly Glu Ser
1 5 10 15

Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn
20 25 30

Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe
35 40 45

Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys
50 55 60

Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asx Ser Val Thr Ile
65 70 75 80

Ser Trp Thr Arg Glu Glu Asn Gly Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile
85 90 95

Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser
100 105 110

Ile Cys Glu Asp Asx Asp Trp Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val
115 120 125

Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro
130 135 140

Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asx Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Glx Glx Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val
165 170 175

Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Glu Trp Met Gln Arg Gly
180 185 190

Glu Pro Leu Ser Pro Gln Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu
195 200 205

Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser
210 215 220

Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His
225 230 235 240

Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
245 250 255

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
260 265 270

Gly Thr Cys Tyr
275

<210> 88
<211> 353
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
35 40 45

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

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
 115 120 125

Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
 130 135 140

Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
 145 150 155 160

Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu
 165 170 175

Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys
 180 185 190

Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
 195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220

Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270

Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
 275 280 285

Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
 290 295 300

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro

325

330

335

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
 340 345 350

Tyr

<210> 89

<211> 222

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Ala Asp Pro Cys Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr
 20 25 30

Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr
 35 40 45

Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu
 50 55 60

Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val
 65 70 75 80

Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr
 85 90 95

His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser
 100 105 110

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
 115 120 125

Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
 130 135 140

Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
 145 150 155 160

Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
 165 170 175

Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu

ES 2 770 330 T3

180

185

190

Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
195 200 205

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 90

<211> 327

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 90

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

ES 2 770 330 T3

[illegible]

<210> 91
<211> 365
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 91

ES 2 770 330 T3

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

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

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

Ala Ser Gln Lys Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly

ES 2 770 330 T3

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

ES 2 770 330 T3

Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
325 330 335

Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
340 345 350

Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
355 360 365

<210> 92

<211> 362

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Met Leu Val Met Ala Pro Arg Thr Val Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser
35 40 45

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

Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln
85 90 95

Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110

Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
115 120 125

Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
130 135 140

Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160

Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu
165 170 175

Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro
195 200 205

Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
260 265 270

Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Ser
290 295 300

Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val
305 310 315 320

Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Cys Arg Arg Lys Ser
325 330 335

Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asp Ser
340 345 350

Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
355 360

<210> 93

5 <211> 366

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 93

10

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

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Cys Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

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

Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
 290 295 300

Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Val Val
 305 310 315 320

Leu Ala Val Leu Gly Ala Val Val Thr Ala Met Met Cys Arg Arg Lys
 325 330 335

Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Cys Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asn
 340 345 350

Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Thr Cys Lys Ala
 355 360 365

<210> 94

<211> 290

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 94

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
 35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
 50 55 60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
 65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
 85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
 130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
145 150 155 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
225 230 235 240

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
245 250 255

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
260 265 270

Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 95
<211> 290
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 95

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

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

<210> 96
<211> 254

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

5

```

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1          5          10          15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
          20          25          30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
          35          40          45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50          55          60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65          70          75          80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
          85          90          95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
          100          105          110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
          115          120          125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130          135          140

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

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
          165          170          175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
          180          185          190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
          195          200          205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210          215          220

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

```

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 97
<211> 302
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 97

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
20 25 30

Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe
85 90 95

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
100 105 110

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

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser
130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser
145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp
165 170 175

Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn
180 185 190

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

Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln
210 215 220

Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp
225 230 235 240

Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
245 250 255

Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala
260 265 270

Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly
275 280 285

Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val
290 295 300

<210> 98

<211> 183

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 98

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

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

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

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

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

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
 130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
 145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
 165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 180

<210> 99

<211> 273

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220

Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240

Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255

Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270

Ile

<210> 100

<211> 288

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

5

10

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 101
<211> 329
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

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

Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30

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

ES 2 770 330 T3

275						280					285				
Arg	Glu	Glu	Ser	Glu	Gln	Thr	Lys	Lys	Arg	Glu	Lys	Ile	His	Ile	Pro
290						295					300				
Glu	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Gln	Arg	Val	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Ser
305				310			315					320			
Ser	Cys	Asp	Lys	Ser	Asp	Thr	Cys	Phe							
325															

<210> 102

<211> 281

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 102

ES 2 770 330 T3

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

ES 2 770 330 T3

				165					170					175		
Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	
		195					200					205				
His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Asp	Leu	Val	Met	
	210					215					220					
Met	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Ser	Tyr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gln	Met	Trp	Ala	
225					230					235					240	
Arg	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	His	
				245					250					255		
Leu	Tyr	Val	Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Asn	Phe	Glu	Glu	Ser	
			260					265					270			
Gln	Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu								
		275					280									

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido multimérico que comprende:

5 un polipéptido heterodimérico que comprende:

a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) un epítipo peptídico; y

10 ii) un primer polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II;

b) un segundo polipéptido que comprende un segundo polipéptido del MHC de clase II, y

c) al menos un polipéptido inmunomodulador,

15 donde el primer y/o el segundo polipéptido comprenden el al menos un polipéptido inmunomodulador, donde el epítipo peptídico es un epítipo de un autoantígeno, y opcionalmente, donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o un andamiaje no Ig.

20 2. El polipéptido multimérico de la reivindicación 1, donde el polipéptido multimérico comprende:

a1) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) un epítipo; y

25 ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y

b1) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) al menos un polipéptido inmunomodulador;

30 iii) un segundo polipéptido del MHC de clase II; y

ii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig); o

a2) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

35 i) un epítipo;

ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y

iii) al menos un polipéptido inmunomodulador; y

b2) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

40 i) un segundo polipéptido del MHC de clase II; y

ii) un polipéptido Fc de Ig; o

a3) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

45 i) un epítipo; y

ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y

b3) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

50 i) un segundo polipéptido del MHC de clase II; y

ii) un polipéptido Fc de Ig; y

iii) al menos un polipéptido inmunomodulador; o

55 a4) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) un epítipo; y

ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y

60 b4) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

i) un segundo polipéptido del MHC de clase II; y

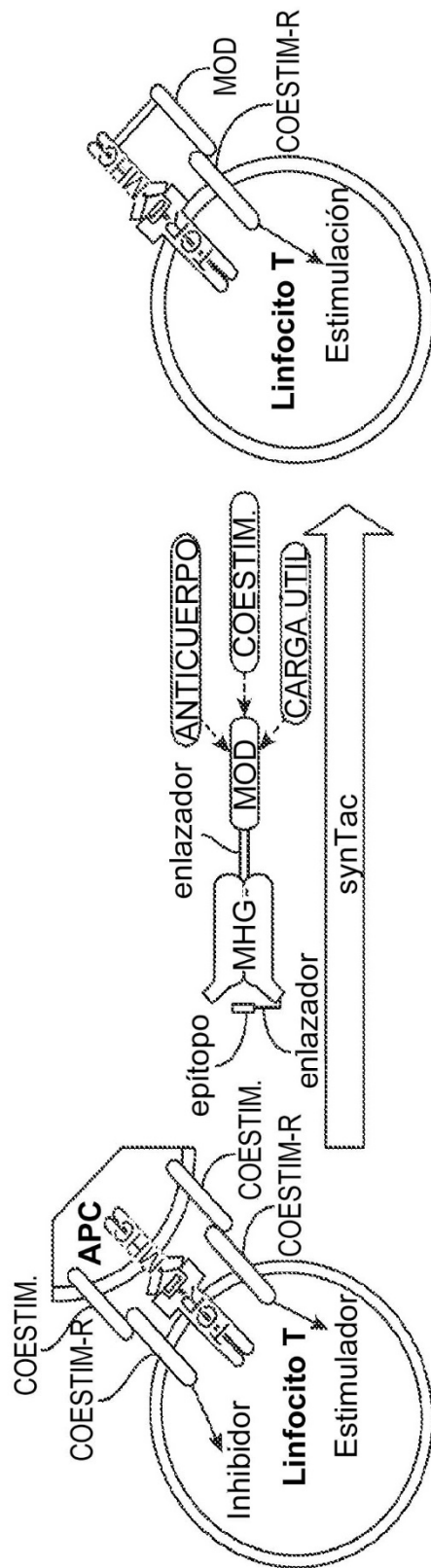
ii) al menos un polipéptido inmunomodulador; o

65 a5) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

- i) a un epítipo; y
 - ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y
- 5 b5) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:
 - i) al menos un polipéptido inmunomodulador; y
 - ii) un segundo polipéptido del MHC de clase II; o
- 10 a6) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:
 - i) un epítipo;
 - ii) un primer polipéptido del MHC de clase II; y
 - iii) al menos un polipéptido inmunomodulador; y
- 15 b6) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:
 - i) un segundo polipéptido del MHC de clase II.
- 20 3. El polipéptido multimérico de la reivindicación 1, donde el andamiaje no Ig es un polipéptido XTEN, un polipéptido de transferrina, un polipéptido del receptor Fc, un polipéptido de tipo elastina, un polipéptido de tipo seda, o un polipéptido de tipo seda-elastina.
- 25 4. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el primer polipéptido del MHC de clase II es un polipéptido de cadena beta del MHC de clase II; y donde el segundo polipéptido del MHC de clase II es un polipéptido de cadena alfa del MHC de clase II.
- 30 5. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el primer polipéptido del MHC de clase II es un polipéptido de cadena alfa del MHC de clase II; y donde el segundo polipéptido del MHC de clase II es un polipéptido de cadena beta del MHC de clase II.
- 35 6. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el al menos un polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL, una citocina y un polipéptido PD-L2.
- 7. El polipéptido multimérico de la reivindicación 6, donde el al menos un polipéptido inmunomodulador se selecciona de un polipéptido PD-L1, un polipéptido FasL y una citocina.
- 40 8. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende 2 o más polipéptidos inmunomoduladores.
- 9. El polipéptido multimérico de la reivindicación 8, donde los 2 o más péptidos inmunomoduladores están en tándem.
- 45 10. Una proteína que comprende dos de los polipéptidos multiméricos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde cada uno de los dos polipéptidos multiméricos comprende un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) y donde los dos polipéptidos multiméricos están unidos por uno o más enlaces disulfuro entre los polipéptidos Fc de Ig respectivos.
- 50 11. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer y/o un segundo polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
- 13. Una célula hospedadora genéticamente modificada con el vector de expresión de la reivindicación 12.
- 55 14. Un método para inhibir selectivamente la actividad y/o reducir el número de un linfocito T autorreactivo, comprendiendo el método poner en contacto el linfocito T *in vitro* con el polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la proteína de la reivindicación 10, donde dicho contacto inhibe selectivamente la actividad y/o reduce el número de los linfocitos T autorreactivos.
- 60 15. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la proteína de la reivindicación 10, para su uso en un método para inhibir selectivamente la actividad y/o reducir el número de linfocitos T autorreactivos en un individuo, donde dicho polipéptido multimérico o la proteína se administran para inhibir selectivamente la actividad y/o reducir el número de linfocitos T autorreactivos en el individuo.
- 65 16. El polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la proteína de la reivindicación 10, o el ácido nucleico de la reivindicación 11, o el vector de expresión según la reivindicación 12, o uno o más ARNm que

comprenden secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la proteína de la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un individuo.

- 5 17. Una composición que comprende:
 - a) el polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la proteína de la reivindicación 10; y
 - b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 18. Un polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una proteína de la reivindicación 10, para su uso en un método para activar de manera selectiva un linfocito T diana que es específico para el epítipo peptídico presente en el polipéptido multimérico, donde los linfocitos T diana son un linfocito T CD4⁺ específico de epítipo.
- 15 19. Un polipéptido multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una proteína de la reivindicación 10, para su uso en un método para inhibir de manera selectiva un linfocito T diana que es específico para el epítipo peptídico presente en el polipéptido multimérico, donde los linfocitos T diana son un linfocito T CD4⁺ específico de epítipo.
- 20 20. Un polipéptido o una proteína multiméricos para su uso en la reivindicación 18, en donde el linfocito T CD4⁺ específico de epítipo es un linfocito T regulador CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺.



7
6
5
4

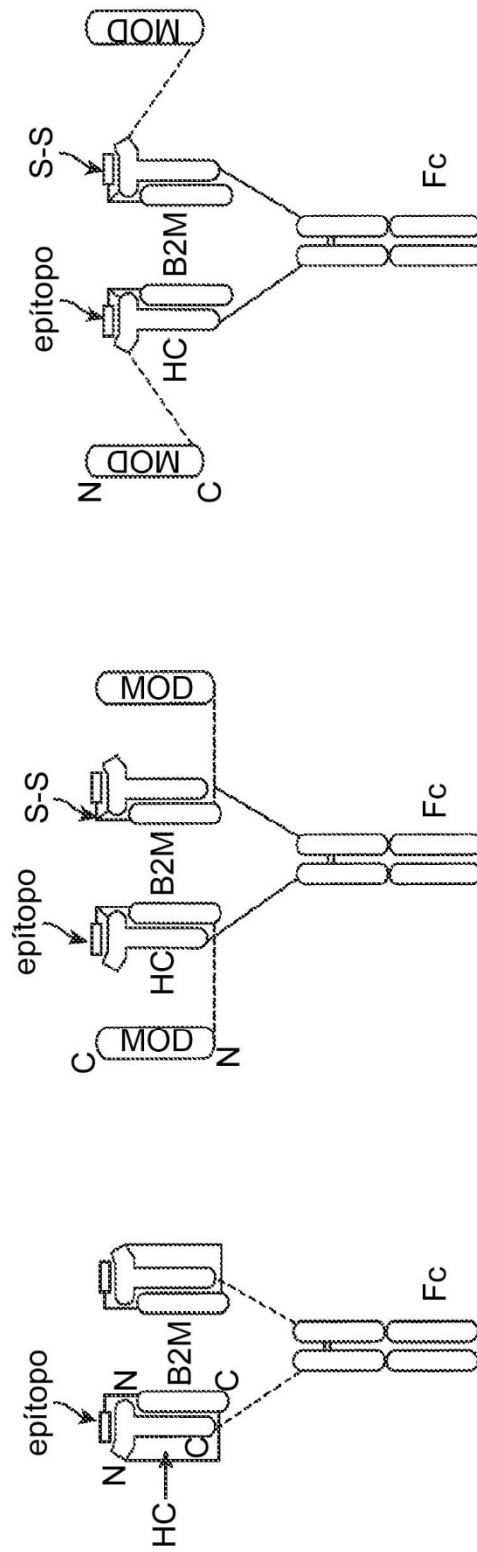


FIG. 20

2025

FIG. 2A

Cadena ligera (LC)

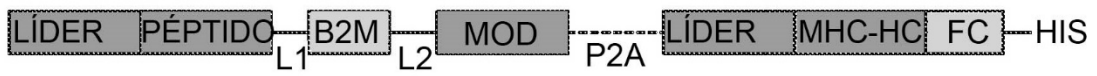


FIG. 3A

Cadena pesada (LC)



FIG. 3B

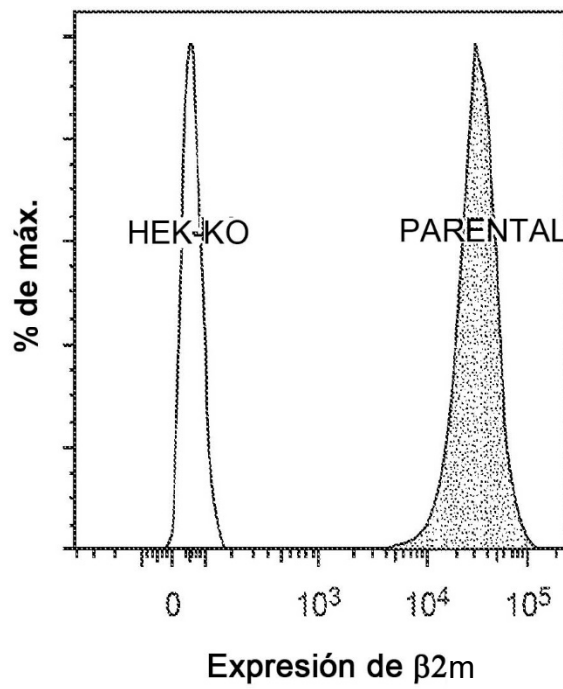


FIG. 4

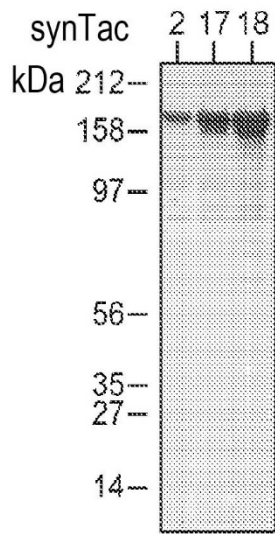


FIG. 5A

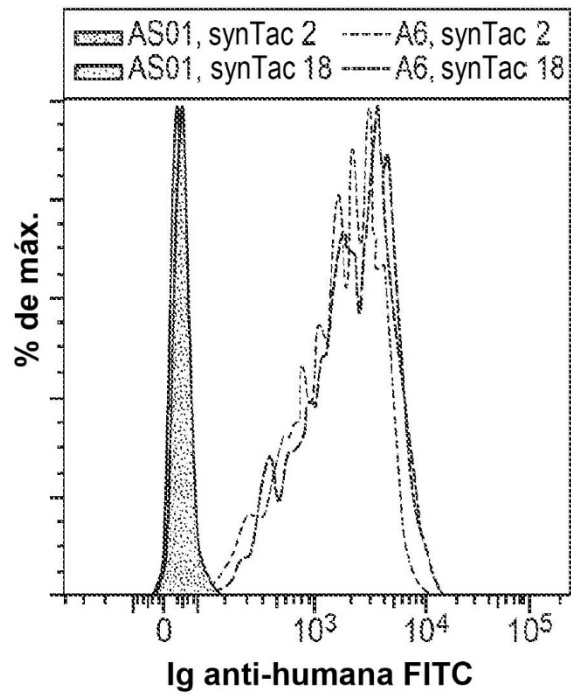


FIG. 5B

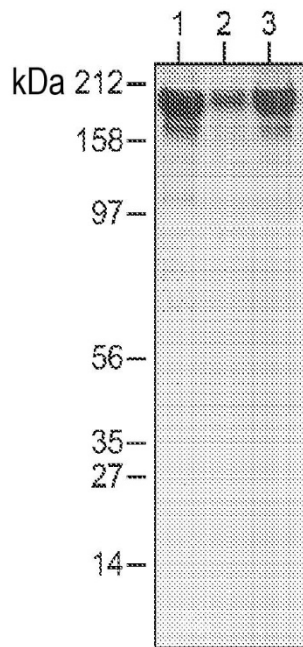


FIG. 6A

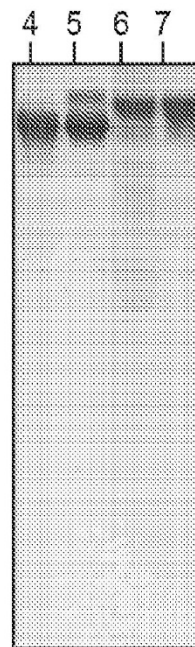


FIG. 6B



FIG. 6C

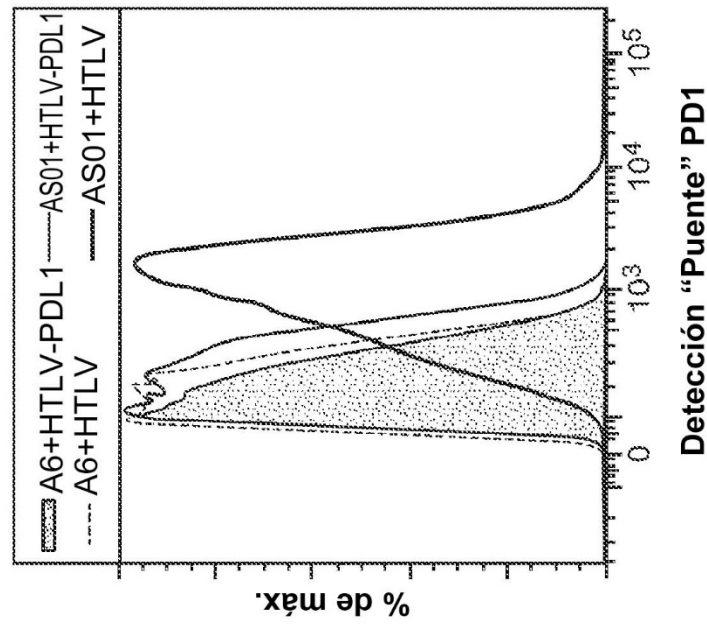


FIG. 7B

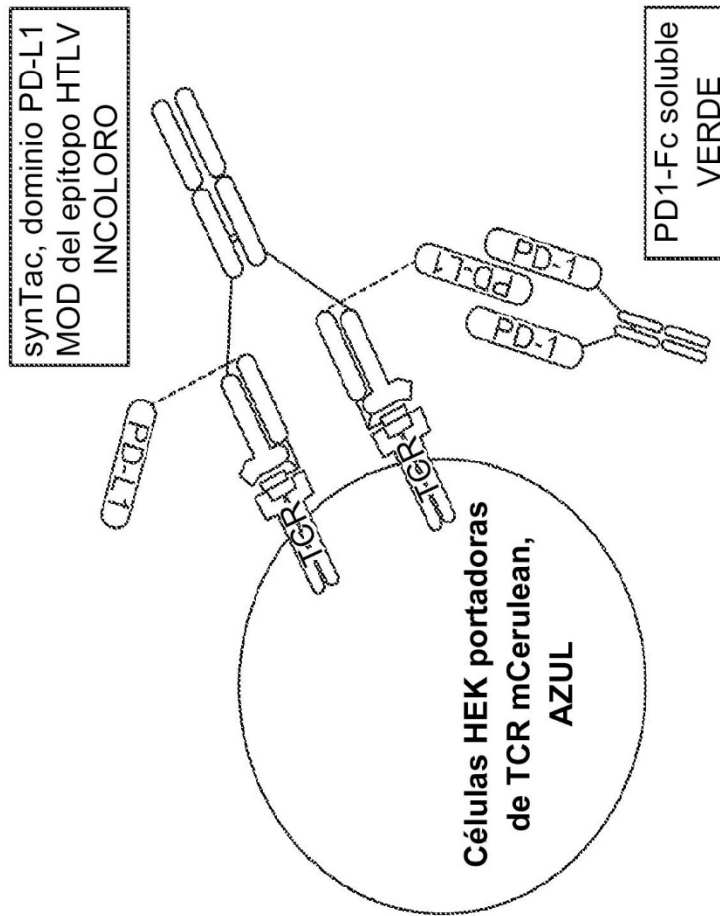


FIG. 7A

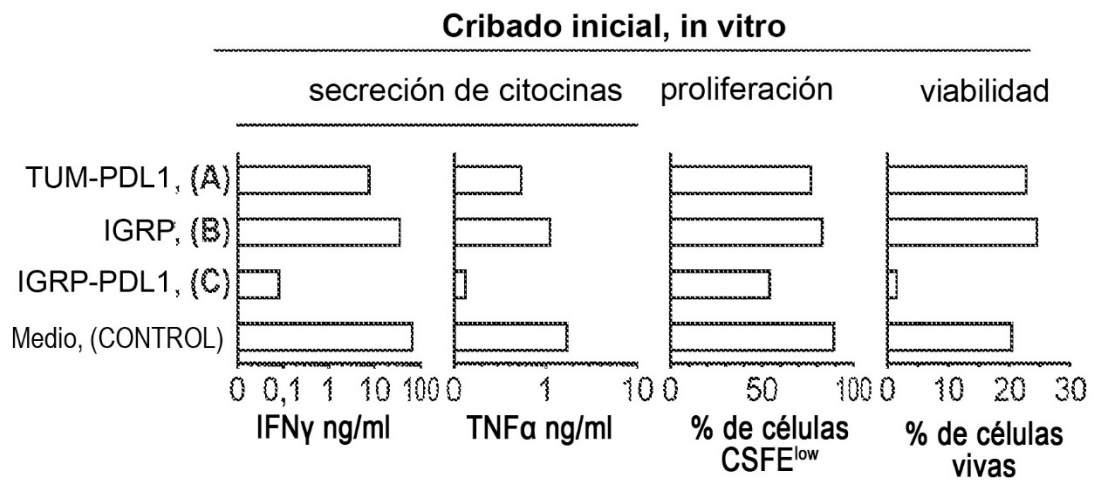
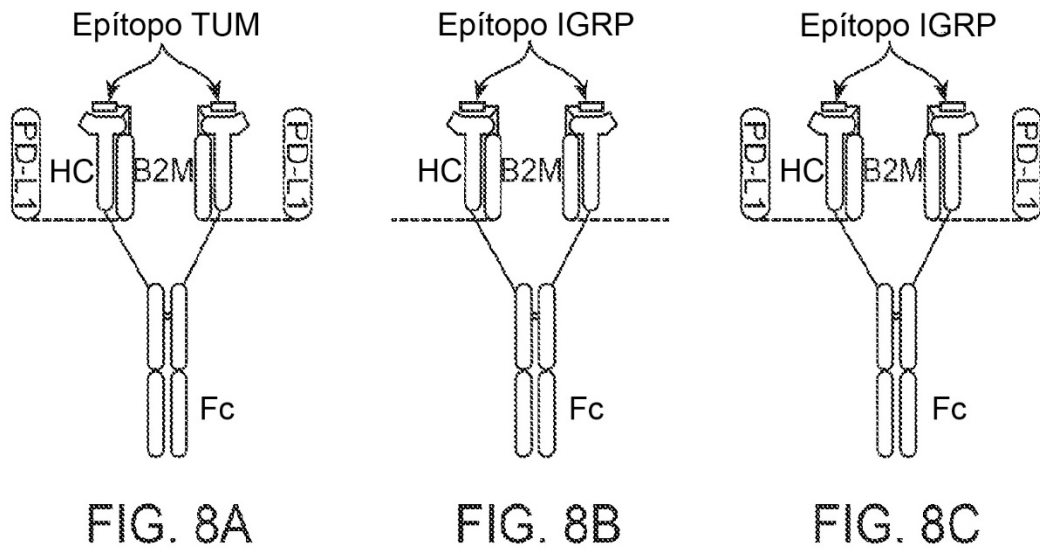


FIG. 8D

synTac 51 - BBL libre (SEQ ID NO:69)

MSRSVALAVLALLSLSGLEAAACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL
SVKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGVSLALHLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFGQGRLLHLHSAGQRLGVHLHTEA
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSE

NEGRITA: Péptido líder de beta-2-microglobulina

CURSIVA EN NEGRITA: 4-1BBL humano, residuos 50-254

(ectodominio completo)

FIG. 9A

synTac 40 - BBL dimérico (SEQ ID NO:70)

MSRSVALAVLALLSLSGLEAVYLKTNVFLGCGASGGGGGSGGSGMIQKTPQIQVYSRHPENGKPNILNCYVTQFHPPHIEIQMLKNGKKIPKVMMSD
MSFSKDWSEFYILAHTEFTPTETDYACRVKHAEMAEPKTVYWRDMGGGGGGGGGGGACPWAVSGARASPGSAASPRLREG
PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGVSLALHLQ
LRSAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFGQGRLLHLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSESGGATNFSLL
KQAGDVEENPGPMRSVALAVLALLSLSGLEAGPHSLRVFTAVSRPGLGEPRFIAVGVDQTFVRFDSADNPRFEPRAPWMEQEGPEY
WEEQTORAKSDEQWFRVSLRTAQRcYNOSKGGSHTEQRMFGCDVGSQWRLRLRGYQOFAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKW
EQAGDAEYYRAYLEGECEVWLRRLYLELGNETLLRTDSPKAHVTHYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQNGEDLTODMELVETRPA
GDGTFQKWAADVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRWAAAGCPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWFEVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHDDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVVLPPPEEEMT
KKQVTLTCMVTDEMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYEMYSKLRVEKKNWVERNSYCSVVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGKGGSHH
HHHHHH

NEGRITA: Péptido líder de beta-2-microglobulina

SUBRAYADO: epítipo de direccionamiento (IGRP), el péptido de control TUM es KYQAVTTTL (SEQ ID NO:18)

CURSIVA EN NEGRITA: 4-1BBL humano, residuos 50-254 (ectodominio completo)

SUBRAYADO EN CURSIVA: Secuencia P2A viral

SUBRAYADO EN NEGRITA: Cadena pesada HLA murina (H-2K^d),

SUBRAYADO EN CURSIVA Y EN NEGRITA: Fc de IgG2a murino, seguido de etiqueta 8x HIS

Mutación Y84C (minúsculas)

FIG. 9B

[illegible]

Mutación Y84C (minúsculas)

MSRSVALAVLALLISGLEAACPWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAcLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL
SYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVRVAGEGSGVSLALHLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNsAFGFQGRLLHLSAGQRLLGVHLHTEA
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEICAGLPSPRSE

synTac 70 - Puente disulfuro formado entre los residuos Q94C y P242C (SEQ ID NO:73)

MSRSVALAVLALLSLGLEAVYLKTNVELGcGASGGGGSGGMIQKTPQIQVYSRHPPENGKPNILNCYVTQFHPHIEIQMLKNGKKPKVEMSD
MSFSKDW/SFYLAHTEFTPTETDTYACRVKHAASMAEPKTVYWDMDMGGGGGSGGGSGGSGGACPWAVSGARASPGSAASPRILREG
PELSPDDDPAGLLDLRQGMFACLV AQNVLLIDGGLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVWAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQP
LRSAAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTCEIPAGLPSRSESGSGATNESLL
KOAGDVEENPGEMSRVALAVLALLSLGLEAGPHSLRYFVTA VSRPGLGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDADNPRFEPRAPWMEQEGPEY
WEEQTORAKSDEQWFRVSLRTAQR CYNOSKGGSHTFORMFGCDVGS DWRLRGYQOFAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKW
EOAGDAEYRAYLEGECEVWLRRLYELEGNELRTDSPKAHVTHYHPRSOVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQDMELVETRPA
GDGTFQKWA AVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRWAAAGPRGPTKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI PPPKIKDVLMISLPIVTCVVVD
YSEDDPDVOISW FVNNVEVHTAQOTHR EDYNSTLRVVSALPIQHODWMSGKEEKC KVNNDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMI
KKQVTLTCMTDEMPEDIYVEWNTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGGSHH
HHHHHH

NEGRITA: Péptido líder de beta-2-microglobulina

SUBRAYADO: epítipo de direccionamiento (IGRP), el péptido de control TUM es KYQAVTTTL (SEQ ID NO:18)

CURSIVA: Beta-2-microglobulina murina

CURSIVA EN NEGRITA: (DL)-4-1 BBL humano bloqueado por disulfuro, residuos 50-254 (ectodominio completo), mutaciones de doble mutante Q94C-P242C

mostrado en minúsculas

CURSIVAS SUBRAYADAS: Secuencia P2A viral

SUBRAYADO EN NEGRITA: Cadena pesada HLA murina (H-2K^d),

SUBRAYADO EN CURSIVA EN NEGRITA: Fc de IgG2a murino, seguido de etiqueta 8x HIS

Mutación Y84C (minúsculas)

Trímeros (DL) bloqueados por disulfuro formados por la coexpresión de DL-4-1BBL libre con synTac que albergan las mismas mutaciones (SEQ ID NO:74)

MSRSVALAVLALLSLGLEAAACPWAVSGARASPGSAASPRILREGPELSPDDDPAGLLDLRQGMFACLV AQNVLLIDGGLSWYSDPGLAGVSLTGGL
SYKEDTKELVWAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTCEIPAGLPSRSE

FIG. 9D

synTac 71 - Puente disulfuro formado entre los residuos Q89C y L115C (SEQ ID NO:75)

MSRSVALAVLALLSLSGLEAVYLKTNVELGcGASGGGGSGGSMIQKTPQIQVYSRHPPENGKPNILNCYVTQFHPPHIEIQMLKN GK KIPK VEMSD
MSFSKDWFSFYLAHTEFTPTETDTYACRVKHASMAEPKTVYWDMDMGSGGGGGSGGGGGGGGACPWAVSGARASPGSAASPRLLREG
PELSPDDPAGLLDLRCGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGcAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGVSLALHLQP
LRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEICAGLPSRSESGSGATNESLL
KQAGDVEENPGEMSRVALAVLALLSLSGLEAGPHSLRYFTAVSRPGLGEPREIAVGYVDDTQFVRFSDADNPRFEPRAPWMEQEGPEY
WEEOTORAKSDEQWFRVSLRTAQRcYNOSKGGSHTFORMFGCDVGSDWRLRGYQOFAYDGRDYIALNEDLKTWTAAADTAALITRRKW
EOAGDAEYRAYLEGECEVWLRRLRYELGNETLRLTDSPKAHVTYHPRSOVDVTLRCWALGFYPADITLTWQNGEDLTQDMELVETRPA
GDGTFOKWAAVVVPLGKEONYTCHVHHKGLPEPLTLRWAAAGGPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVEIFFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVOISWFWNNVEVHTAQOTQTHREDYNSTLRVVSALPIOHODWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT
KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNKYKNTPEVLDSDGSYEMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGGSHH
 HHHHHH

NEGRITA: Péptido líder de beta-2-microglobulina

SUBRAYADO: epítipo de direccionamiento (IGRP), el péptido de control TUM es KYQAVTTTL (SEQ ID NO:18)

CURSIVA: Beta-2-microglobulina murina

CURSIVA EN NEGRITA: (DL)-4-1BBL humano bloqueado por disulfuro, residuos 50-254 (ectodominio completo), mutaciones de doble mutante Q89C-L115C

mostrado en minúsculas

SUBRAYADO EN CURSIVA: Secuencia P2A viral

SUBRAYADO EN NEGRITA: Cadena pesada HLA murina (H-2K^d),

CURSIVA CON SUBRAYADO EN NEGRITA: Fc de IgG2a murino, seguido de etiqueta 8x HIS

Mutación Y84C (minúsculas)

Trímeros (DL) bloqueados por disulfuro formados por la coexpresión de DL-4-1BBL libre con synTac que albergan las mismas mutaciones (SEQ ID NO:76)

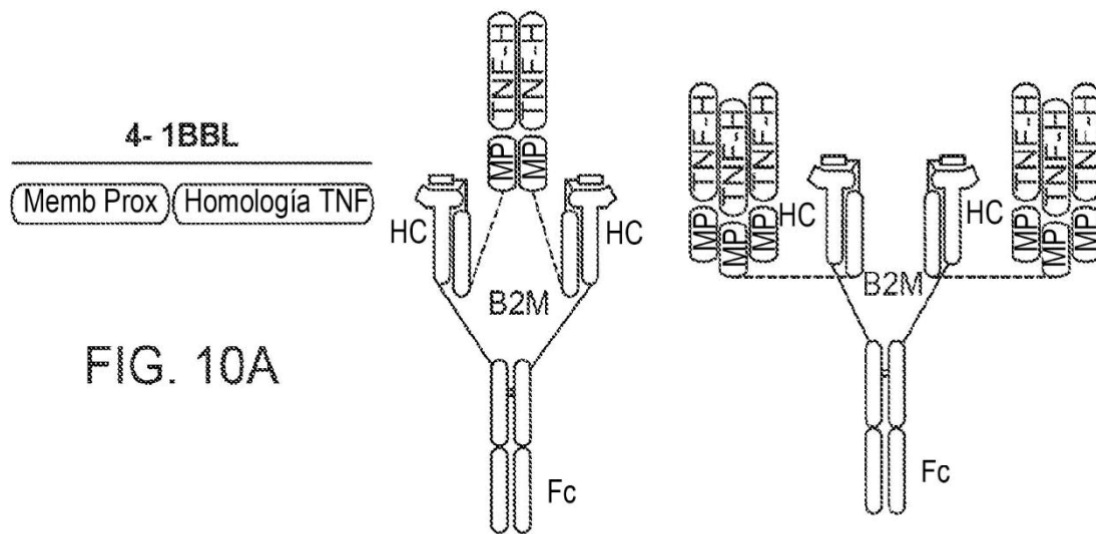
MSRSVALAVLALLSLSGLEAACPWAVSGARASPGSAASPRLLREGPELSPDDPAGLLDLRCGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGcAGVSLTGGL
SYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGVSLALHLQLPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEICAGLPSRSE

FIG. 9E

[illegible]

Mutación Y84C (minúsculas)

909



Syntac #	peso molecular (kDa±%)
40+51	236,2 (±4,9%)
40+51	257,9 (±0,5%)

FIG. 11A

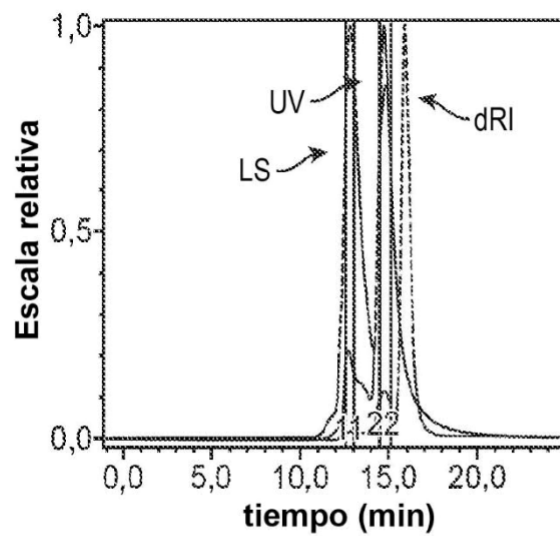


FIG. 11B

Variantes synTac 4-1BBL, unión de perlas

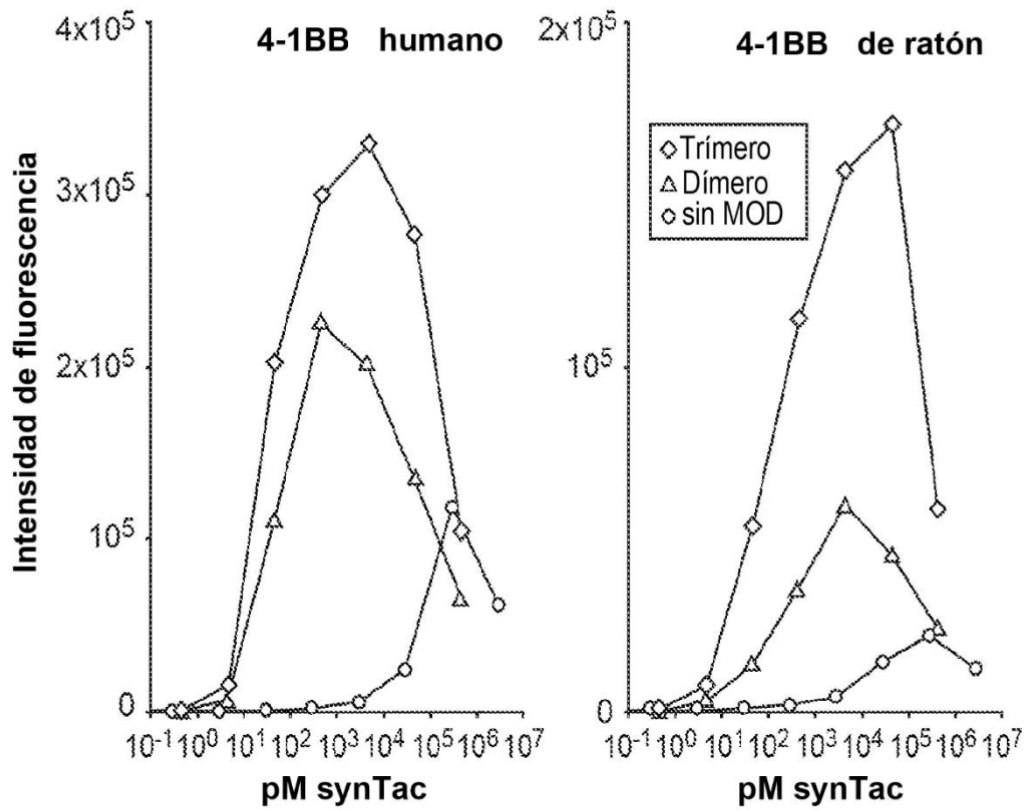


FIG. 12

Cribado inicial, in vitro

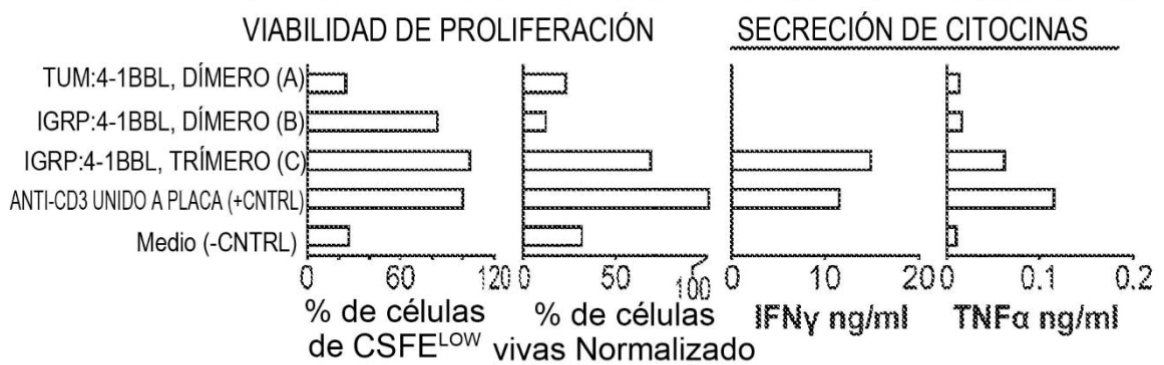
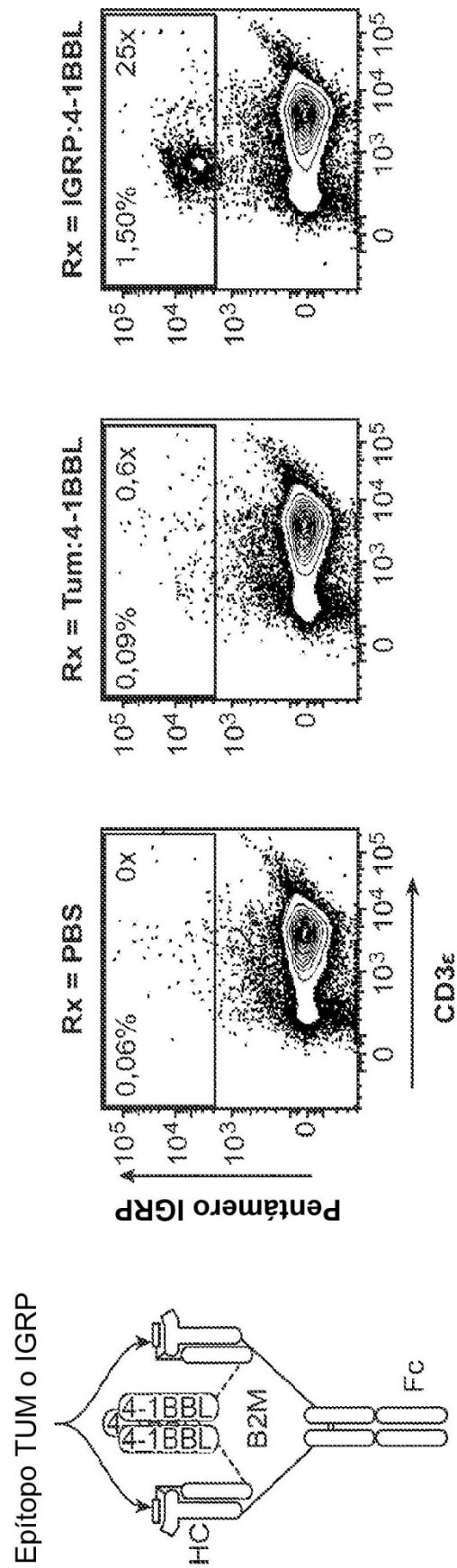


FIG. 13



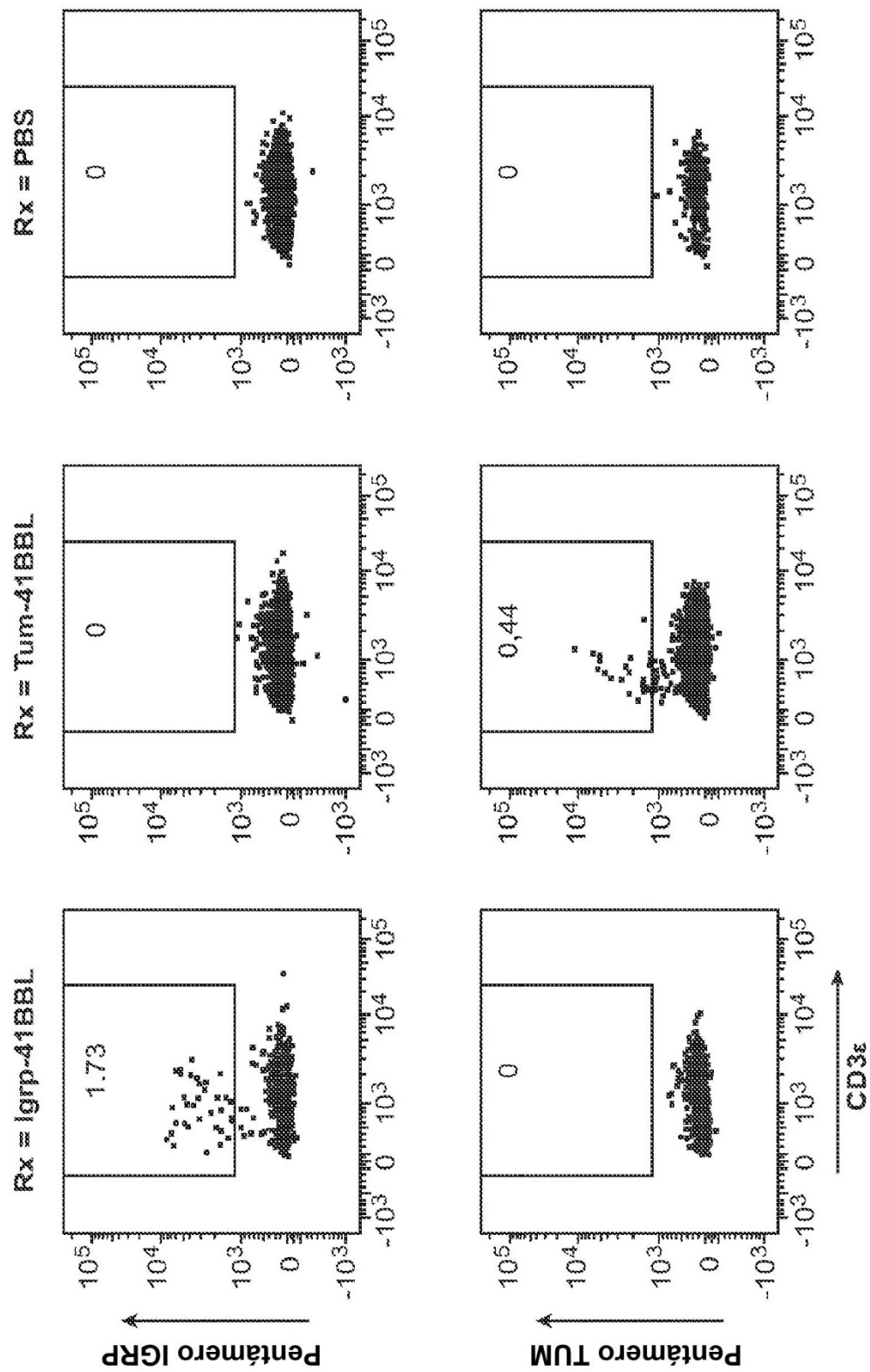


FIG. 15

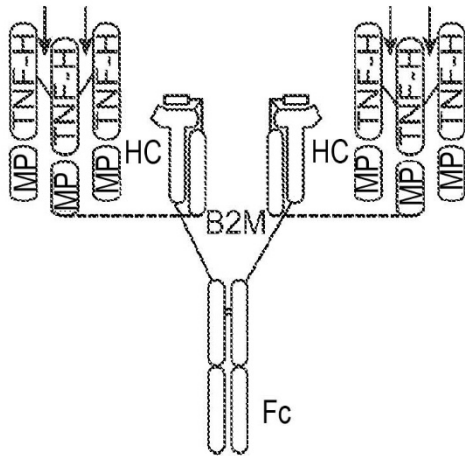


FIG. 16A

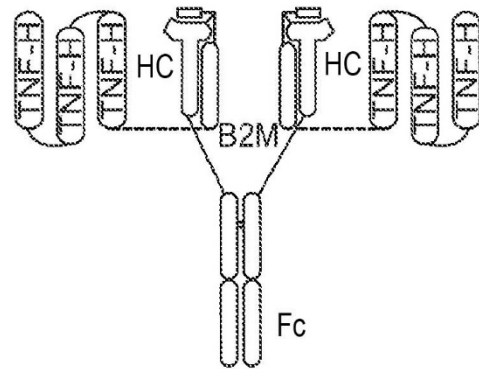


FIG. 16B

Variantes disulfuro synTac 4-1BBL, unión de perlas

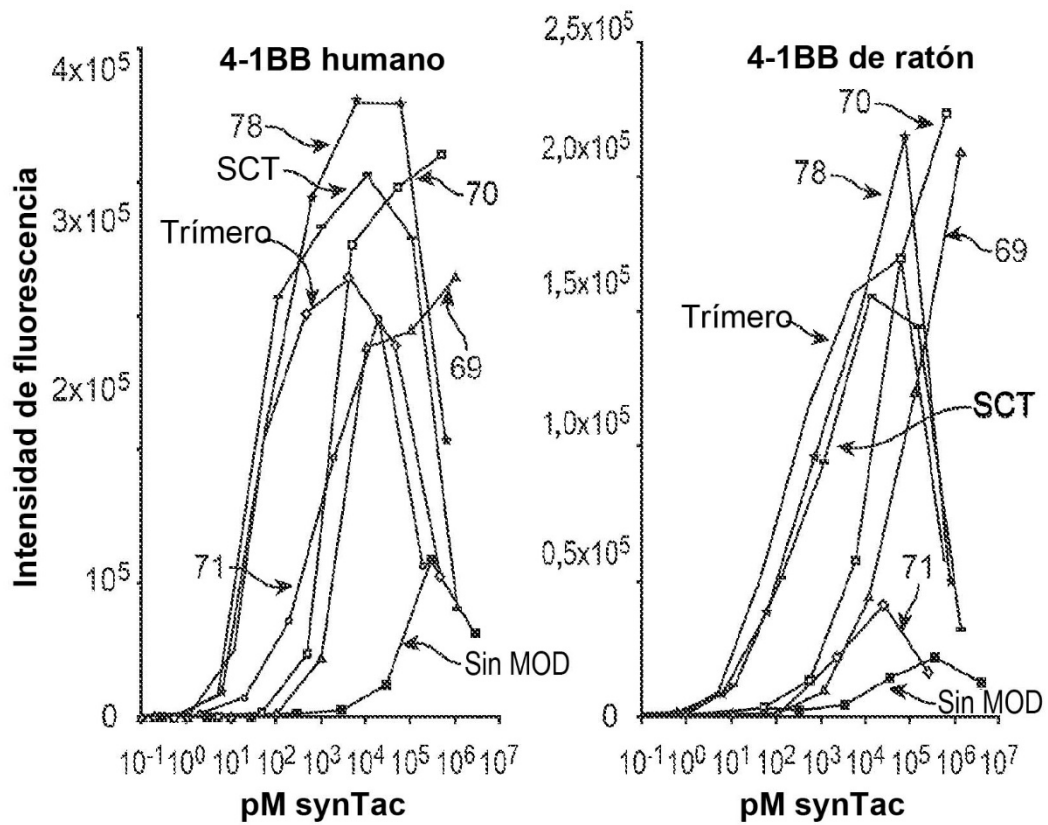


FIG. 17

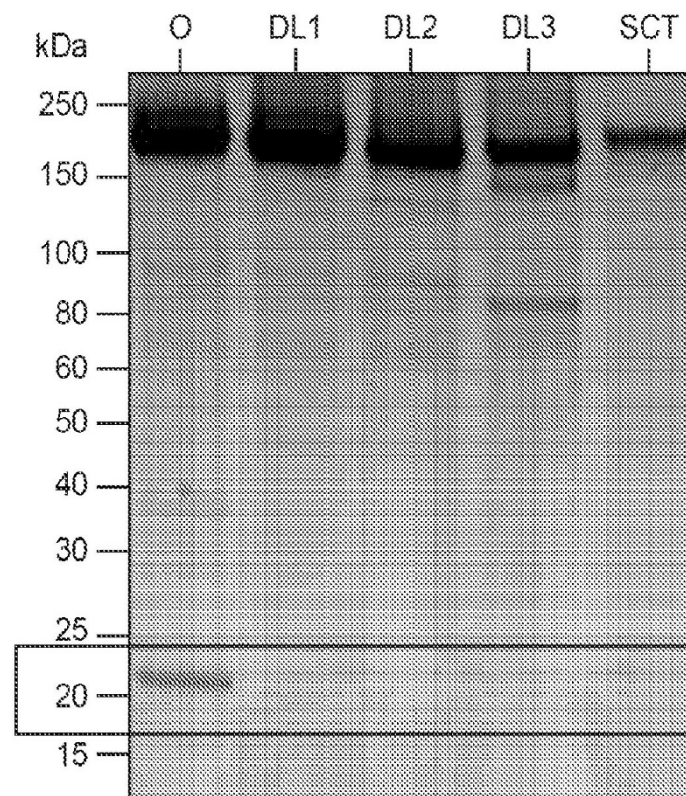


FIG. 18



FIG. 19A

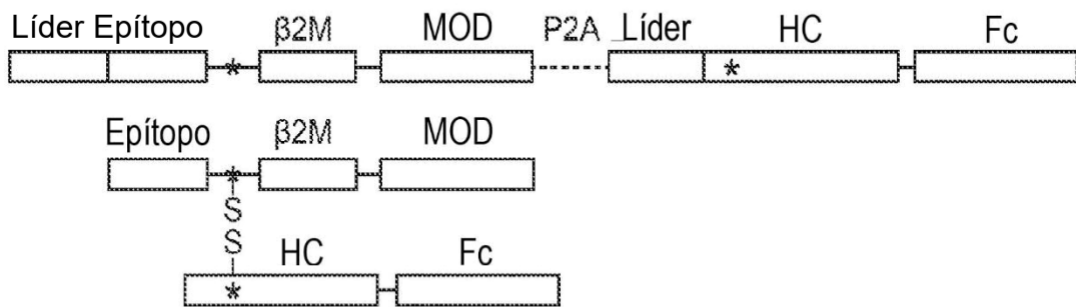


FIG. 19B

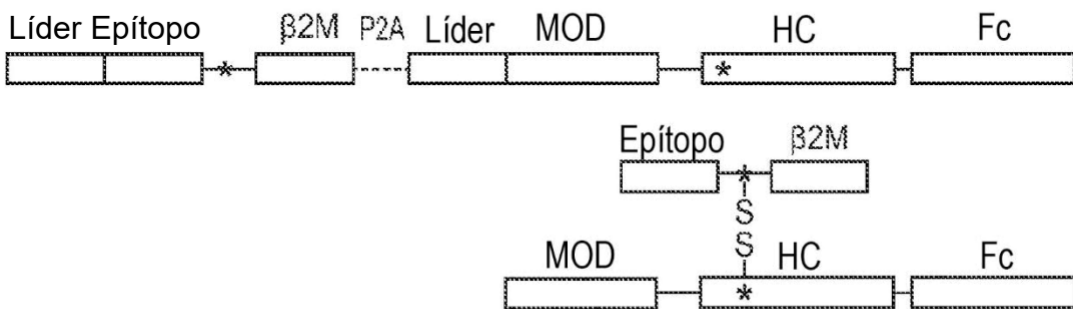


FIG. 19C

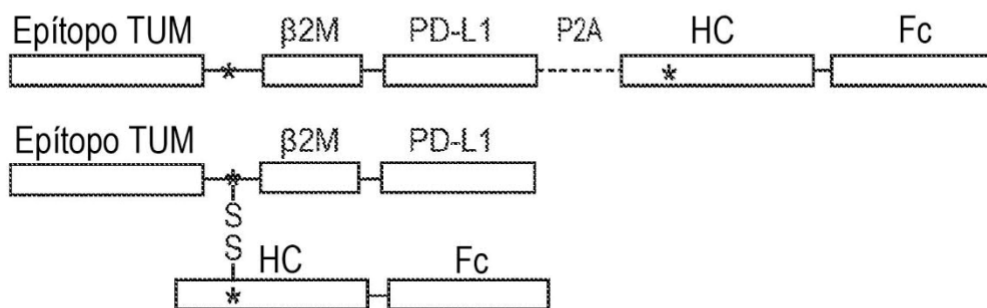


FIG. 19D

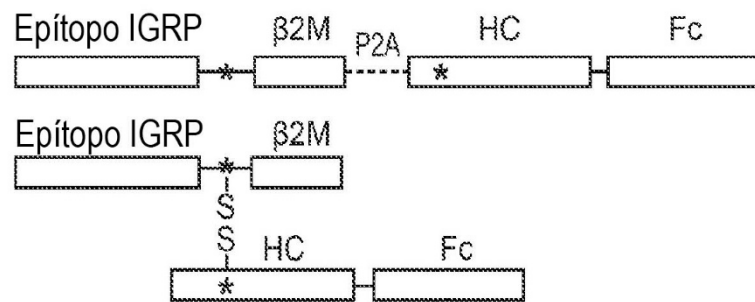


FIG. 19E

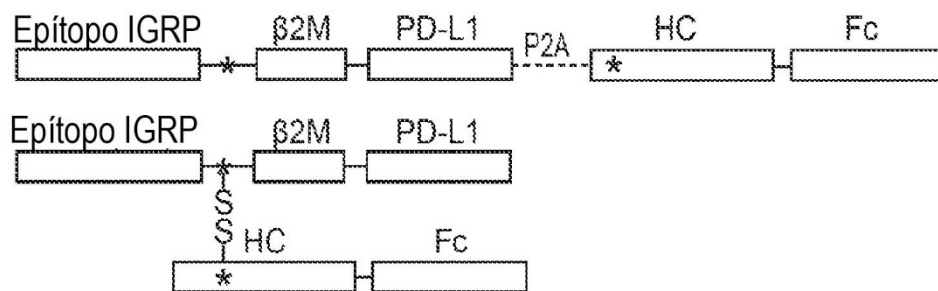


FIG. 19F

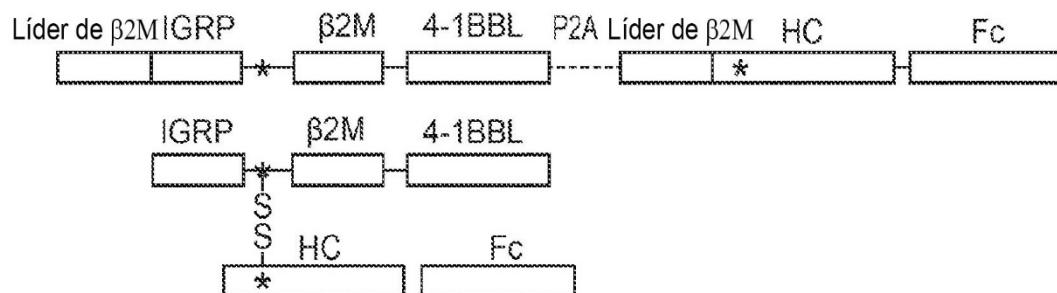


FIG. 19G

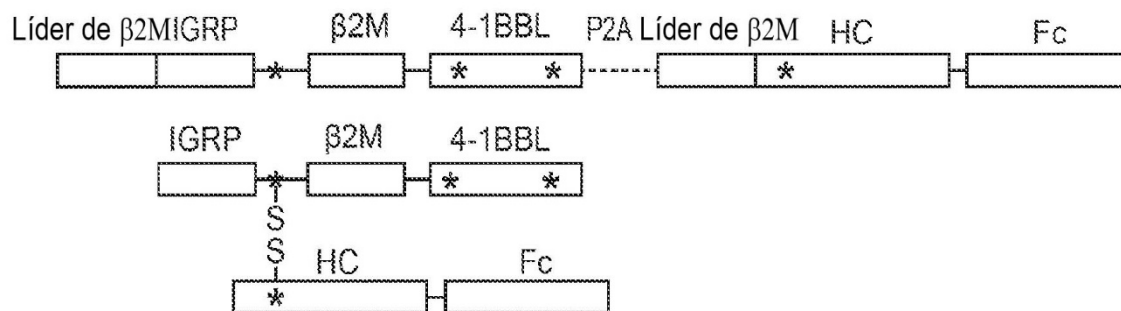


FIG. 19H

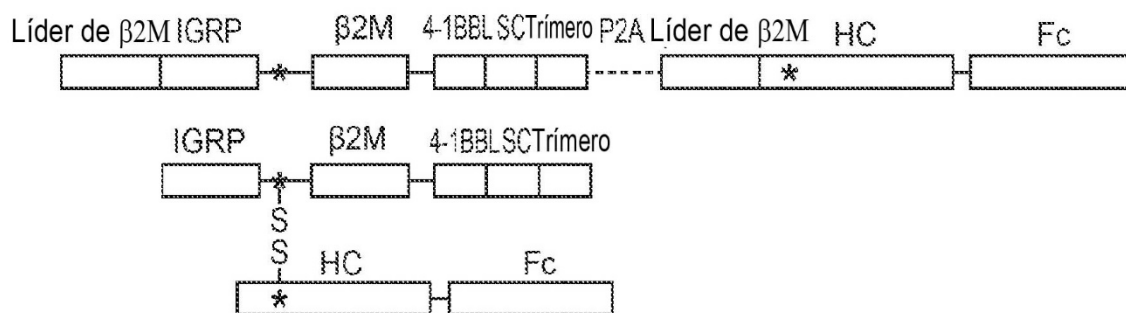


FIG. 19f

```

NP_004039.1      MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHFSIDIEVDLL 60
NP_001009066.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHFSIDIEVDLL 60
NP_001040602.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHFSIDIEVDLL 60
NP_776318.1     MARFVALVLGLGLSLSGLOAIQRPPKIQVYSRHPPFDGKPNYLNCYVYGFHFPQIEIDLL 60
NP_033865.2     MARSVTLVFLVLSLTGLYAIQKTPQIQVYSRHPPFENGKPNILNCYVTQFHFPHIEIQML 60
                *.* *:. * *;.*;.* **;. *;*****.*;.* * **** *;*.*;.*;
NP_004039.1      KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLLYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQLKIVKWDRDM 119 (SEQ ID NO:76)
NP_001009066.1  KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLLYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQLKIVKWDRDM 119 (SEQ ID NO:79)
NP_001040602.1  KNGEKMKGVEHSDLSFSKDWSFYLLLYTEFTPNEKDEYACRVNHVTLSQLKIVKWDRDM 119 (SEQ ID NO:80)
NP_776318.1     KNGEKI-KSEQSOLSPSKDWSFYLLLSHAFTPNKSDQXSCRVKHVTLSEQPRIVKWDRDL 118 (SEQ ID NO:81)
NP_033865.2     KNGKKIPKVEMSDMSFSKDWSFYLARTFTPTETDTYACRVKHAZMAEPKTVYWDKDM 118 (SEQ ID NO:82)
                ***::.* * *;*****.*;*****.* *;*****.*;*****.*;*****

```

FIG. 20

[illegible]

SUBRAYADO DOBLE: Etiqueta His

Σ
Σ
Σ
Σ
Σ

LLECYPVVYGcGGGGGGGGJJQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSPDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW\$FYLLYYTEFTPTTEKD
 EYACRVNHVTL\$QPKVKWDRDMGGGGGGGGGGGGGATNESLLKQAGDVEENPGPM\$RSRYALAVLALL\$LSGLEAFTTITAPKDLVY
 VEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQIVQFVAGEEDLKPOH\$NFRGRASLPKDLQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCHSYGGADYK
 RITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEYPEAEVWITNSDHPVSGKRSVTT\$RTEGMLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPQGQH
 TAEIIPELPATHPPQNRTCGGGGGGGGGGGGSHSMRYFTTSVSRPGRGEPRI\$AVGYVDDTQFVRFSD\$AASQRM\$EPRAPWIEQ
 EGPEYWDGETR\$VKKAHSQTHRVDLGLTRGcYNQ\$EAG\$HTVQRMYGCDVGD\$WRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQ
 TTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHH\$AVSDHEATLRCWAL\$FYPAEITL\$TWQRDGEDQTQDT
 ELVETRPAGDGT\$QKWA\$AVVPSGQEQR\$Y\$TCHVQHEGLPKPLTLRWEPAAAGGDKTH\$TCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKD\$TLMISR\$TPE
 VTCVVVD\$SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN\$TYRVS\$VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQ\$SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK\$TTPPVLD\$SDG\$SFELYSKLTVDK\$SRWQ\$QGNVFC\$SVMHEALHNHY\$TQK\$LSLSP
 GKGGSHHHHHHHHH

SUBRAYADO DOBLE: Etiqueta His

20.

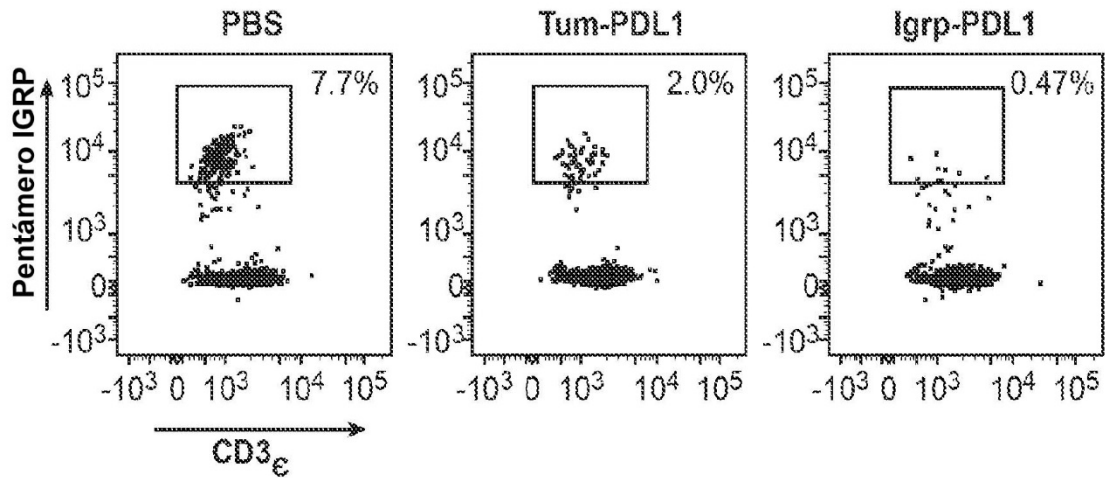


FIG. 23

GenBank 3S7G_A

Fc de IgG1 de Homo sapiens (SEQ ID NO:83)

227 aa

```

1 dkthtcppcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevkfnwyvd
61 gvevhnaktk preeqynsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkappa piektiskak
121 gqprepvytl lpsrdeltk nqsltcclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqgg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk

```

GenBank AAN76044

Fc de IgG2 de Homo sapiens (aminoácidos 99-325) (SEQ ID NO:84)

227 aa

```

1 stkgpsvfpl apcsrstses taalgcclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktkverk ccvecppcpa ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm lsrtpevtcv vvdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgg prepqvytlp psreemtknq
241 vsltclvkf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk

```

GenBank AAW65947

Fc de IgG3 de Homo sapiens (aminoácidos 19-246) (SEQ ID NO:85)

238 aa

```

1 hkpsntkvdk rvelktplgd tthtcppcpa pellggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc
61 vvdvshedp evkfnwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlhq dwlngkeykc
121 kvsnkappa iektiskakg qprepvytl ppsrdeltkn qvsltcclvk gfypsdiavew
181 esngqpenny kttppvlds dgsfflysklt vdksrwqqgn vscsvmheal lhnhytqksl
241 slspgk

```

FIG. 24A

ES 2 770 330 T3

GenBank AAA52770

Fc de IgD de Homo sapiens (aminoácidos 162-383) (SEQ ID NO:86)

222 aa

```

1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlacilit gyhptsvtvt wymgtqsgpq rtfpeiqrid
61 syymtssqls tplqgwrqge ykcvvghtas kskkeifrwpe espkagassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkkkakakeeq eeretktped pshtqplgvy lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgdldkdaht ltwevagkvp tggveegile rhsngsgsqh srltlprslw
241 nagtsvtctl nhpslppgrl malrepaaqa pvklslhlla ssdppeaasw llcevsgfsp
301 pnillmwled grevntsgfa parpppqprs ttfwawsvlr vpappspqpa tytcvvhed
361 srltlnasrs levsyvdhng pmk

```

GenBank 0308221A

Fc de IgM de Homo sapiens (SEQ ID NO:87)

276 aa

```

1 vtstltikzs dwlgesmftc rvdhrgltfq qnassmcvdpd qdtairvfai ppsfasiflt
61 kstkltclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvylppa rzzlnresa titclvtgfs
181 padvfvewmq rgeplspqky vtsapmpepq aggryfahsi ltvseeewnt ggtytcvvhah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvalvmsd tagtocy

```

FIG. 24B

GenBank P01876

Fc de IgA de Homo sapiens (aminoácidos 120-353) (SEQ ID NO:88)

234 aa

```

1 asptspkvfp lslcstqpdg nvviacvlvgg ffpqgeplsvt wsesgggvtat rnfppsqdas
61 gdllyttssql tlpatqclag ksvtchvkhy tnpsqdytvp cpvpstppptp spstppptpsp
121 scchprish rpaedlllg seanltotlt glrdasgvtf twtpssgksa vggpperdic
181 gcysvssvlp gcaepwnhkg tftctaaype sktpltatls ksgntfrpev hllpppseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqgsge lprekyltwa srqepsqgtt tfavtsilrv
301 aaedwkkgdg fscmvghael plaftgktid rlagkpthvn vsvvmaevdg tcy

```

GenBank IF6A_B

Fc de IgE de Homo sapiens (aminoácidos 6-222) (SEQ ID NO:89)

212 aa

```

1 adpcdsnprg vsaylerpsp fdifirkspt itclvvdlap skgtvnltws rasgkpvnhs
61 trkeekqng tltvtstlpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk tsgpraapev
121 yafatpewpg ardkrtlacl iqnfmpedis vqwlhnevql pdarhsttqp rktkgagffv
181 fsrlevtrae weqkdeficr avheaaspsq tvqravsvnp gk

```

GenBank P01861

Fc de IgG4 de Homo sapiens (aminoácidos 100-327) (SEQ ID NO:90)

228 aa

```

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepytvs wnsгалtsgv htfpavlgss
61 glyslssvvt vpssslgkkt ytcnvdhkps ntkvdkrves kygppcpscp afeilggpsv
121 flfppkpkdt lmsrtpevt cvvvdvsqsd pevqfnwyvd gvevhnatk preeqfnsty
181 rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvankgpls siektiskak gqprepgvyt lppsqeemtk
241 nqvsltclvk gfyosdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysrll tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alnhhytqks lsllslgk

```

FIG. 24C

Homo sapiens

GenBank NP_001229687

HLA-A

Aminoácidos 25-365 (SEQ ID NO:91)

```

1  mavmaprtll lllsgalalt qtwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg yvddtqfvrf
61 dsdaasqkme prapwiegeg peywdqetrn mkahsqtdra nlgtlrgyyn qsedgshtiq
121 imygcdvgpd grflrgyrqd aydgkdyial nedlrswhaa dmaaqitkrk weavhaaeqr
181 rvylegrcvd glrrylengk etlqrtddpk thmthhpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtg dtelvetrpa gdtgfkwaaw vvvpsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwl
301 ssqptipivg iiaglvllga vitgavvaav mwrkssdrk ggsytqaass dsaggsdvs1
361 tackv

```

FIG. 25A

Homo sapiens

GenBank NP_005505

HLA-B

Aminoácidos 25-362 (SEQ ID NO:92)

```

1  mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytsvsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaasprea prapwiegeg peywdntqi ykaqaqtdre slrnlrgyyn qseagshtlq
121 smygcdvgpd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswhaa dtaaqitqrk weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtg dtelvetrpa gdrtfkwaaw vvvpsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwep
301 ssqstvipvg ivaglavlav vvigavvaav mcrkssggk ggsysqaacs dsaggsdvs1
361 ta

```

FIG. 25B

Homo sapiens

GenBank NP_001229971

HLA-C

Aminoácidos 25-366 (SEQ ID NO:93)

```

1  mrvmaprall lllsgglalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaasprge prapwvegeg peywdretqn ykrqaqadv slrnlrgyyn qsedgshtlq
121 rmygcdlgpd grllrgydqs aydgkdyial nedlrswhaa dtaaqitqrk leaaraaeql
181 raylegtcve wlrrylengk etlqraepk thvthhplsd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtg dtelvetrpa gdtgfkwaaw vvvpsgqeqr ytchmghegl qepltlswep
301 ssqptipimg ivaglavlvv lavlgavvta mmcrkssgg kggscsqaac snsaggsdes
361 litcka

```

FIG. 25C

PD-L1

Mus musculus

NP_068693

Aminoácidos 19-290 (SEQ ID NO:94)

```

1 mrifagiift acchllraft itapkdlyvv eygsnvtmec rfpvereldl lalvvyweke
61 deqviqfvag eedlkipqhsn frgrasipkd qlkkgnaalq itdvklqdag vycciisyyg
121 adykritlkv napyrkinqr isvdpatsch elicqaegyp eaeviwtnd hqpvsgkrsv
181 ttsrtegmll nvtsslrva tandvfycf wrsqpgqht aeliipelpa thppqnrthw
241 vllgsillfl ivvstvlfl rkqvrmdve kogvedtssk nrndtqfeet

```

FIG. 26A

PD-L1

Homo sapiens

NP_054852

Aminoácidos 19-290 (SEQ ID NO:95)

```

1 mrifavfifm tywhllnaft vtpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekql dl aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvhss yrqrarilkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisygg
121 adykritkv napyrkinqr ilvdpvtse heltcqaegy pkaevitss dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frldpeenh taelvipelp lahppnerth
241 lvlgaillic lgvaltfifr lrkgrmdvk kogiqdtnsk kgsdthleet

```

FIG. 26B

4-1-BBL

Homo sapiens

GenBank NP_003802

Aminoácidos 50-254 = ectodominio (SEQ ID NO:96)

```

1 meyasdasld peapwppapr aracrvlpwa lvagllllll laaacavfla cpwavsgara
61 spgsaasprl regpelspdd paglldlrqg mfaqlvaqnv lldgplswy sdpglagvsi
121 tgglsykedt kelvvakagv yyvffqlelr rvvagegsgs vslaihlqpl rsaagaaala
181 itvdlppass earnsafgfg grllhlsagq rlgvhltea rarha wqltq gatvlgflrv
241 tpeipaglps prse

```

FIG. 27

Homo sapiens

ICOS-L

GenBank NP_056074

Aminoácidos 19-302 (SEQ ID NO:97)

```

1 mrlgspglif llfsslradt qekevramvg sdvelscacp egsrfdlndv yvywqtsek
61 tvvtyhipqn sslenvdsry rnralspag mrgdfslrl fnvtpqdegk fhclvlsqsl
121 gfqevlsvev tlhvaaansv pvvsaphsps qdeltftcts ingyprpnvy winktdnsll
181 dqalqndtvf lnmrglydv svlriartps vnigccienv llqqnlvgs qtgndigerd
241 kitenpvstg eknaatwsil avlcillvva vaigwvcrdr clqhsyagaw avspeteltg
301 hv

```

FIG. 28

Homo sapiens
GenBank NP_003317
OX4L (SEQ ID NO:98)

```

1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv iqglglllcf tyiclhfsal qvshrypriq
61 sikvqfteyk kekqfilitq kedeimkvqn nsviincdgg yllslkgyfs qevnislhyq
121 kdeepflqfk kvrsvnslmv asltykdkvy lrvtttdntsl ddfhvnggel ilihqnpgef
181 cvl

```

FIG. 29

Homo sapiens
GenBank NP_079515
PD-L2
Aminoácidos 20-273 (SEQ ID NO:99)

```

1 mifllllmlsl elqlhqiaal fttvtpkely iiehgsvntl ecnfdtgshv nlgaitaslq
61 kvendtsphr eratllleeql plgkasfhip qvqvrdeggy qciiiygvaw dykyltlkvk
121 asyrkinthi lkvpemdeve ltcqatgypl aevswpnvsv pantshsrtp eglyqvtsvl
181 rlkpppggrnf scvfwnthvr eltlasidq sqmeptrthpt wllhifipfc iiafifiatv
241 ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai

```

FIG. 30

Homo sapiens
GenBank NP_005182
CD80 (B7-1)
Aminoácidos 35-288 (SEQ ID NO:100)

```

1 mghtrrrqgts pskcpylnff qlvlaglsf fcsqvihvtk evkevatlsc ghnvsveela
61 qtriywqkek kmvltnmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpslsdf eiptsnirri icstsggfpe phlswlence
181 elnainttvs qdpetelyav sskldfntt nhsfmcliky ghrlvngtfn wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

FIG. 31

Homo sapiens
GenBank NP_787058
CD86 (B7-2)
Aminoácidos 31-229 (SEQ ID NO:101)

```

1 mdpqctmglsl nilfvmafll sgaaplkiqa yfnetadlpc qfansqnqsl selvvfwqdq
61 enlvlnvnyl gkekfdsvhs kymgrtsfds dswtlrlhnl qikdkglyqc iihhkkptgm
121 irihqnnsl svlanfsqpe ivpisniten vyinltcssi hgypepkms vllrtknsti
181 eydgimqksq dnvteydvsl slsvsfpdv tsnmtifcil etdktrllss pfsielepqp
241 pppdhipwit avlptviicv mvfclilkwk kkkkrprnsy kcgntnmere eseqtkkrek
301 ihipersdea qrvfksskts scdksdtcf

```

FIG. 32

Ligando Fas (FasL)

Homo sapiens

GenBank NP_000630

Aminoácidos 1-281 (SEQ ID NO:102)

```

1  mqqpfnyppp qiywvdssas spwappgtvl pcptsvprp gqrrpppppp ppplpppppp
61  ppplpplppp lkkrgnhstg lcilvmffmv lvalvglglg mqlfhlqke laelrestsq
121 mhtasslekq ighpspppek kelrkvahgksnsrsmpl ewedtygivl lsgvkykkgg
181 lvinetglyf vyskvyfrgq scnnlpishk vymrnskypq dlvmmegkmm sycttgqmw
241 rssylgavfn ltsadhlyvn vselslvnfe esqtffglyk l
    
```

FIG. 33

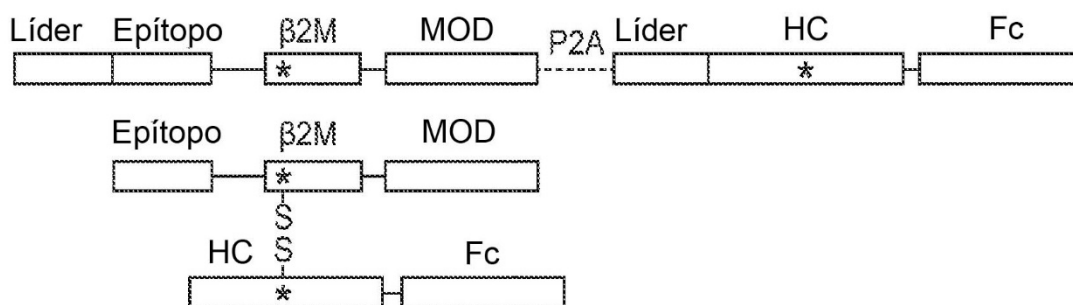


FIG. 34A

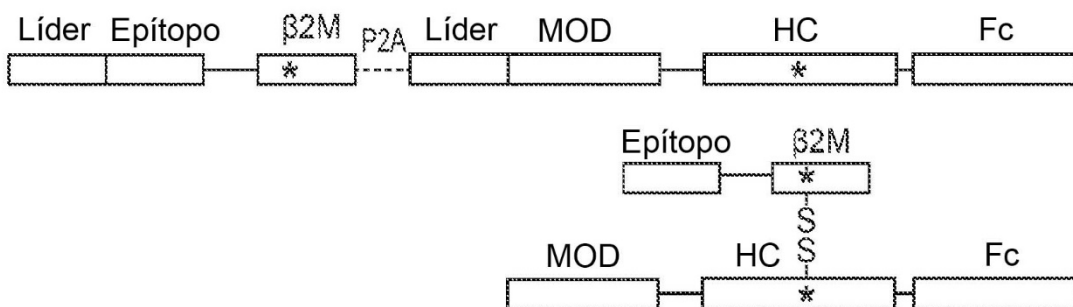


FIG. 34B

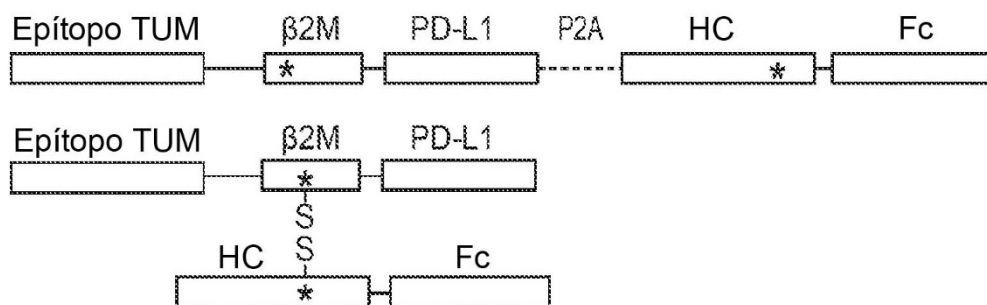


FIG. 34C

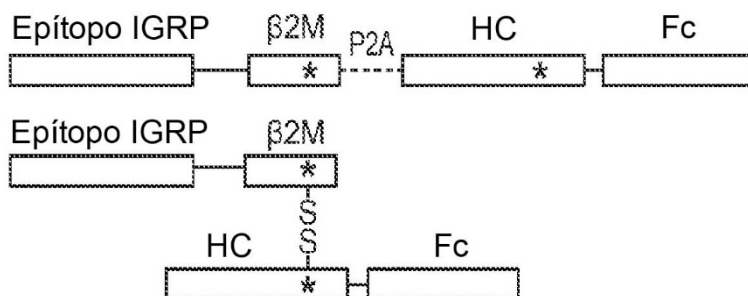


FIG. 34D

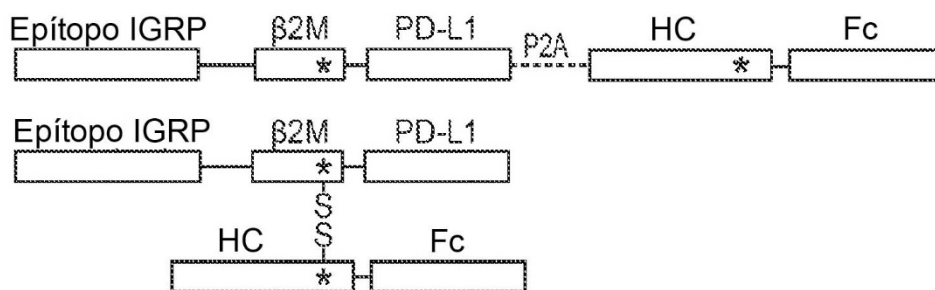


FIG. 34E

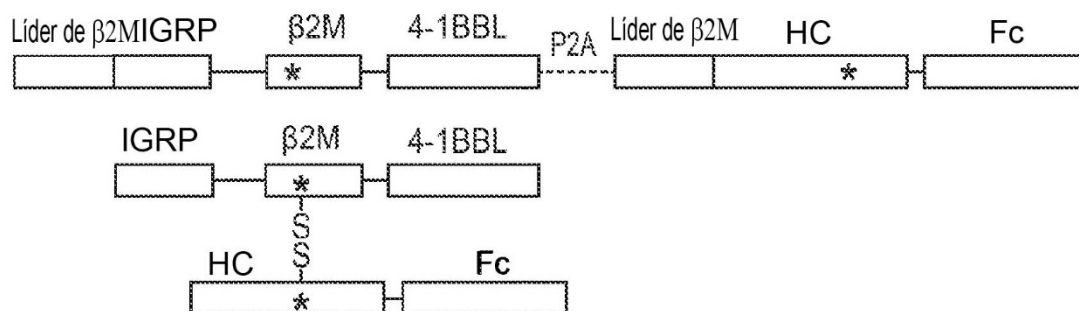


FIG. 34F

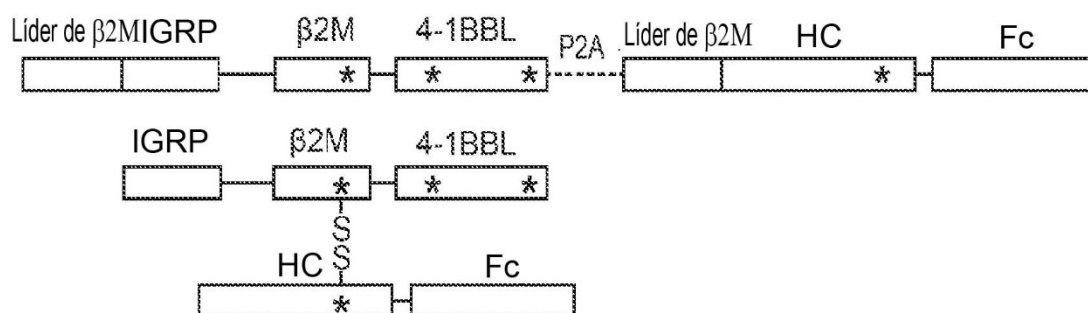


FIG. 34G

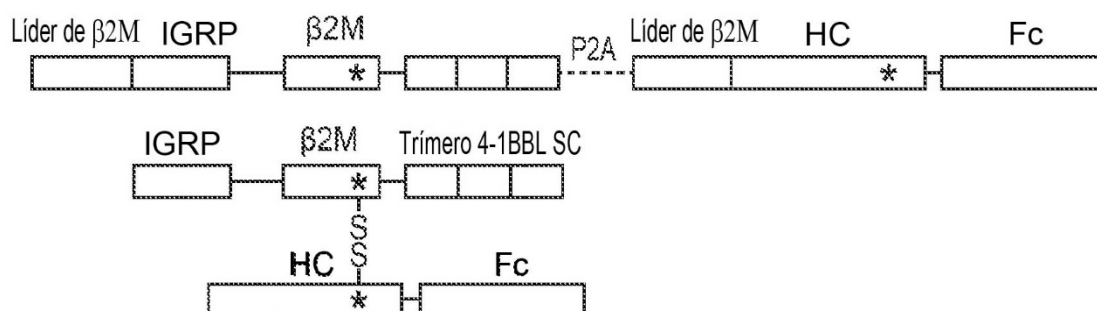


FIG. 34H