

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 451**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2015 PCT/US2015/044356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2015 E 15829652 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3177640**

54 Título: **Agentes PD-1 de alta afinidad y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

08.08.2014 US 201462035316 P

21.04.2015 US 201562150789 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**RING, AARON MICHAEL;
KRUSE, ANDREW;
MANGLIK, AASHISH;
WEISSMAN, IRVING L.;
MAUTE, ROY LOUIS;
MCCRACKEN, MELISSA N. y
GORDON, SYDNEY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 819 451 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

Agentes PD-1 de alta afinidad y procedimientos de uso

5 INTRODUCCIÓN

La activación de las células T depende de una señal específica de antígeno proporcionada a los receptores de células T. Señales adicionales, por ejemplo, señales coestimuladoras (positivas) y/o coinhibidoras (negativas), ajustan esta respuesta, ayudando a determinar su fuerza, naturaleza y duración. Las interacciones coestimuladoras potencian la activación y proliferación de las células T, mientras que las interacciones coinhibidoras promueven la regulación. Por ejemplo, los correceptores CD28 y CTLA-4 se unen a las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). CD28 actúa como un fuerte receptor coestimulador positivo y CTLA-4 como un potente receptor coinhibidor.

Un receptor conocido como el receptor de muerte programada-1 (PD-1) se expresa en las células T, células B y células mieloides, y se une al ligando de muerte programada (PD-L). Este par receptor-ligando funciona principalmente para proporcionar señales inhibitorias (p. ej., a través del reclutamiento de fosfatasa, como SHP-2, al motivo de cambio basado en tirosina de inmunorreceptor (ITSM) de la cola citoplasmática de PD-1).

La señalización de PD-1 juega un papel importante en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Se ha demostrado que los ligandos PD-1 (PD-L) en las células presentadoras de antígeno inhiben las células T autorreactivas e inducen tolerancia periférica, mientras que las de las células parenquimatosas impiden la destrucción del tejido al suprimir las células T efectoras para mantener la tolerancia. El papel inhibitorio de PD-1 se destaca por el fenotipo de ratones con deficiencia de PD-1, que desarrollan diversas enfermedades autoinmunes, dependiendo del origen genético. La vía PD-1/PD-L es frecuentemente explotada como una diana para la evasión inmune por células tumorales y por una amplia gama de patógenos. Por ejemplo, la vía PD1:PD-L puede ser explotada (p. ej., hiperactivada) por tumores y virus (p. ej., virus que causan infección crónica), que pueden expresar proteínas PD-L para estimular PD-1 (p. ej., en células T), reduciendo así las respuestas de células inmunes (p. ej., células T) y evadir la erradicación por parte del sistema inmune.

El documento US 2011/0159023 A1 (LANGERMANN) describe una proteína de muerte celular programada (PD-1) que tiene la sustitución A99L que aumenta la unión del ligando natural PD-L2 de PD-1 pero no PD-L1.

La presente descripción proporciona polipéptidos PD-1 de alta afinidad que se unen específicamente a PD-L1, bloqueando/reduciendo la interacción de PD-L1 con PD-1 en la superficie de las células (p. ej., células inmunes como las células T) y, por lo tanto, bloqueando/reduciendo la actividad de PD-1 estimulada por PD-L1. También se describen procedimientos para usar polipéptidos PD-1 de alta afinidad para reducir la actividad de PD-1.

Por consiguiente, la presente invención proporciona polipéptidos de muerte celular programada de alta afinidad (PD-1) como se establece en las reivindicaciones 1 a 13.

40

RESUMEN

Los polipéptidos son variantes de secuencias de una proteína PD-1 natural (por ejemplo, la proteína PD-1 humana natural), y tienen utilidad para procedimientos *in vivo* e *in vitro* que bloquean la interacción entre una proteína PD-1 natural y su ligando PD-L (PD-L1 y/o PD-L2). Un polipéptido PD-1 de alta afinidad de la invención incluye al menos un cambio de aminoácidos en relación con una proteína PD-1 natural, tiene una afinidad aumentada por PD-L (PD-L1 y/o PD-L2) en relación con la proteína PD-1 natural, y carece de un dominio transmembrana de una proteína PD-1 natural. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una mayor afinidad pueden localizarse en las posiciones de contacto de aminoácidos entre PD-1 y PD-L, y/o puede ubicarse en el dominio de inmunoglobulina de la proteína PD-1 de la que se deriva.

50

Un polipéptido PD-1 de alta afinidad de la invención puede modificarse postraduccionalmente, por ejemplo, por glucosilación, PEGilación, etc. Un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad puede ser una proteína de fusión (es decir, puede incluir secuencias de aminoácidos adicionales), por ejemplo, una fusión con secuencias Fc de anticuerpos y/o una región variable de un anticuerpo que proporciona la unión específica a un antígeno de interés; y similares. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetramero, etc.

55

En esta invención se describen procedimientos proporcionados para modular la actividad de las células inmunes (células T, células NK, etc.) en un mamífero mediante la administración de una dosis terapéutica de una composición

60

farmacéutica que comprende un polipéptido PD-1 de alta afinidad, que bloquea la interacción de unión fisiológica entre PD-1 y su ligando PD-L1 y/o PD-L2.

- La descripción también incluye formulaciones farmacéuticas que tienen un polipéptido PD-1 de alta afinidad en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones pueden proporcionarse como una dosis unitaria, *por ejemplo*, una dosis efectiva para bloquear la interacción de PD-1 en una primera célula con PD-L (PD-L1 y/o PD-L2) en una segunda célula dentro de un individuo. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen preparaciones liofilizadas u otras de los polipéptidos PD-1 de alta afinidad, que pueden reconstituirse para su uso.
- 10 En algunos procedimientos, se estimula una respuesta inmune hacia las células diana, por ejemplo, apuntando a la destrucción de las células cancerosas vivas por el sistema inmune. En tales procedimientos, una célula que expresa PD-L1 se pone en contacto con un polipéptido PD-1 de alta afinidad en una dosis efectiva para bloquear la interacción entre PD-1 endógeno (p. ej., en una primera célula) y PD-L (PD-L1 y/o PD-L2, por ejemplo, en una segunda célula). El bloqueo de esta interacción permite la destrucción inmune de células diana que no se destruyen en ausencia del polipéptido PD-1 de alta afinidad. El contacto puede realizarse *in vivo*, *por ejemplo*, con fines terapéuticos, e *in vitro*, *por ejemplo*, para ensayos de detección y similares. El polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad para estos fines puede ser multimérico; o monomérico. Los reactivos monoméricos encuentran un uso particular para administración en combinación con un anticuerpo que se une selectivamente a la célula diana.
- 15 20 La invención incluye un polipéptido de muerte celular programada de alta afinidad (PD-1) para el uso como se establece en la reivindicación 13.

- Las personas infligidas que pueden tratarse con un polipéptido PD-1 de alta afinidad incluyen personas que tienen cáncer, personas que albergan una infección (por ejemplo, una infección crónica, una infección viral, etc.), personas que tienen un trastorno inmunológico (p. ej., un trastorno asociado con la inmunosupresión), individuos que tienen un trastorno inflamatorio, y/o individuos que tienen otras afecciones hiperproliferativas, por ejemplo, esclerosis, fibrosis y similares, etc. En algunos casos, las células cancerosas, por ejemplo, las células tumorales, son dianas para eliminación al contactar las células del sistema inmune con una dosis de polipéptido PD-1 de alta afinidad que es efectiva para bloquear o enmascarar la interacción de PD-1 con PD-L, lo que permite una mayor estimulación del sistema inmune. En algunos casos, la célula diana (por ejemplo, una célula infligida como una célula cancerosa, una célula tumoral, una célula infectada, etc.) expresa PD-L1 y/o PD-L2, y un polipéptido PD-1 de alta afinidad bloquea la interacción de PD-L en la célula diana con PD-1 en una célula inmune (por ejemplo, una célula T, una célula NK, etc.), que puede bloquear la capacidad de la célula diana para suprimir una respuesta inmune contra la célula diana.
- 25 30 35 La administración de una dosis efectiva de polipéptido PD-1 de alta afinidad a un paciente impide la interacción entre PD-1 y PD-L1, lo que puede aumentar la eliminación de las células tumorales y/o células infectadas (p. ej., células infectadas crónicamente). En algunos casos, el polipéptido PD-1 de alta afinidad se puede combinar con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores de células tumorales, cuya terapia de combinación puede ser sinérgica para mejorar la eliminación de células cancerosas en comparación con la administración de cualquiera de los agentes como una entidad única. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 activable comprende una etiqueta detectable. Tal reactivo etiquetado puede usarse para propósitos de imagen *in vitro* o *in vivo*, *por ejemplo*, en la imagen de un tumor. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad puede usarse como una herramienta de diagnóstico para la detección de PD-L (por ejemplo, células que expresan PD-L1), y puede usarse como un diagnóstico complementario para evaluar si un régimen de tratamiento particular ha sido exitoso.

- 45 Se proporcionan polipéptidos PD-1 de alta afinidad. En algunos casos, un polipéptido PD-1 de alta afinidad es una variante de una secuencia PD-1 natural, pero carece del dominio transmembrana de PD-1 y comprende uno o más cambios de aminoácidos en relación con una secuencia correspondiente del polipéptido PD-1 natural, donde uno o más cambios de aminoácidos aumentan la afinidad del polipéptido por PD-L1 en comparación con la afinidad por PD-L1 del correspondiente polipéptido PD-1 natural. En algunos casos, el polipéptido de PD-1 tiene una K_d de 1×10^{-7} M o menos para PD-L1. En algunos casos, la afinidad por PD-L1 del polipéptido PD-1 de alta afinidad es 5 veces o mayor que la afinidad por PD-L1 de dicho polipéptido PD-1 que no tiene un cambio de aminoácido en relación con una secuencia correspondiente de un polipéptido PD-1 natural. En algunos casos, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad tiene una afinidad disminuida por PD-L2 en comparación con la afinidad por PD-L2 de dicho polipéptido mimético PD-1 que no tiene un cambio de aminoácido en relación con una secuencia correspondiente de un polipéptido PD-1 natural. En algunos casos, uno o más cambios de aminoácidos se encuentran en una posición de aminoácidos de PD-1 que contacta con PD-L1. En algunos casos, uno o más cambios de aminoácidos se encuentran en una posición de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: V39, N41, Y43, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, P105, K106 y A107; o la posición de aminoácidos correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural. En algunos casos, uno o
- 50 55 60

más cambios de aminoácidos se encuentran en una posición de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, y A107; o la posición de aminoácidos correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural. En algunos casos, uno o más cambios de aminoácidos son 5 o más cambios de aminoácidos.

También se proporcionan polipéptidos PD-1 de alta afinidad que comprenden uno o más cambios de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: (1) V39H o V39R; (2) L40V o L40I; (3) N41I o N41V; (4) Y43F o Y43H; (5) R44Y o R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, o M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, o N49S; (9) Q50K, Q50E, o Q50H; (10) T51V, T51L, o T51A; (11) D52F, D52R, D52Y, o D52V; (12) K53T o K53L; (13) A56S o A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V; (16) Q66P; (17) V72I; (18) H82Q; (19) M83L o M83F; (20) R90K; (21) Y96F; (22) L97Y, L97V, o L97I; (23) A100I o A100V; (24) S102T o S102A; (25) L103I, L103Y, o L103F; (26) A104S, A104H, o A104D; (27) P105A; (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T; y (29) A107P, A107I, o A107V; o un cambio que da como resultado el mismo aminoácido en la posición correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural.

También se proporcionan polipéptidos PD-1 de alta afinidad que comprenden cambios de aminoácidos ubicados en las posiciones de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: (a) V39, N41, Y43, M45, S48, N49, Q50, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (b) V39, N41, Y43, M45, S48, Q50, T51, D52F, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (c) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, M83, L97, A100 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (d) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66P, M83, L97 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (e) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66P, H82, M83, L97, A100 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (f) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, M83, L97, A100 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (g) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, L97, A100 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; y (h) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, L97, A100 y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural.

También se proporcionan polipéptidos PD-1 de alta afinidad que comprenden cambios de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: (a) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (b) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {T51V, T51L, o T51A}, {D52F, D52R, D52Y, o D52V}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (c) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (d) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (e) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {H82Q}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (f) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (g) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; y (h) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I

o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural.

- 5 También se proporcionan polipéptidos PD-1 de alta afinidad que comprenden los cambios de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2, seleccionado de entre: (a) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48G, N49Y, Q50E, K53T, A56S, Q63T, G65L, Q66P, L97V, S102A, L103F, A104H, K106V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (b) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48N, Q50H, T51A, D52Y, K53T, A56L, Q63L, G65F, Q66P, L97I, S102T, L103F, 10 A104D, K106R, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (c) V39H, L40V, N41V, Y43H, R44Y, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100I, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (d) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, Q66P, M83L, L97V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; 15 (e) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49S, K53T, Q66P, H82Q, M83L, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (f) V39H, L40I, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (g) V39H, L40V, N41I, Y43H, R44L, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I; o 20 cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (h) V39H, L40V, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; y (i) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural.

25

En algunos casos, el polipéptido PD-1 de alta afinidad incluye (por ejemplo, está fusionado con) un compañero de fusión. En algunos casos, el compañero de fusión es un fragmento de una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina humana (por ejemplo, un fragmento se selecciona de entre: (a) un dominio CH3; y (b) parte o la totalidad de una región Fc). En algunos casos, el compañero de fusión se selecciona de entre: un dominio de 30 multimerización; una citocina; una citocina atenuada; un agonista de 41 BB; agonista de CD40; un inhibidor de BTLA y/o CD160; y un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1.

- En algunos casos, el polipéptido PD-1 de alta afinidad es multimérico (p. ej., dimérico). En algunos de estos casos, el polipéptido PD-1 de alta afinidad incluye (por ejemplo, está fusionado con) un compañero de fusión y el compañero 35 de fusión incluye un dominio de multimerización (por ejemplo, una dimerización). Por ejemplo, en algunos casos, el compañero de fusión es un dominio CH3 (de una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina humana).

- En algunos casos, un polipéptido PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye una o más mutaciones correspondientes a 40 R87C, N91C, y/o R122C en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2. En algunos casos, un polipéptido PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 3-25 y 39- 46) En algunos casos, el polipéptido PD-1 de alta afinidad incluye una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta de imagen de tomografía por emisión de positrones (TEP)). En algunos casos, un polipéptido PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye una o más mutaciones correspondientes a R87C, N91C, y/o R122C en 45 relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2, y también incluye una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta de imagen de tomografía por emisión de positrones (TEP)).

También se describe una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido PD-1 de alta afinidad en cuestión.

- 50 También se describen ácidos nucleicos. Un ácido nucleico en cuestión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PD-1 de alta afinidad. En algunos casos, el ácido nucleico incluye además (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un TCR (por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido alfa TCR y un polipéptido beta TCR de un TCR); y/o (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el ácido nucleico es un vector de expresión (por ejemplo, un vector lineal, un vector circular, 55 un plásmido, un vector viral, etc.).

- También se describen células que incluyen dicho ácido nucleico (por ejemplo, células humanas, células de primates, células de ratones, células de mamíferos) (por ejemplo, una célula inmune, un leucocito, una célula T, una célula T CD8, una célula T CD4, una célula T de memoria/efectora, una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC), 60 una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, una célula NK, una célula madre, una célula madre hematopoyética,

una célula madre pluripotente, una célula madre multipotente, una célula madre restringida por tejido, etc.). En algunos casos, la célula es una célula inmune. En algunos casos, la célula es una célula madre o progenitora. En algunos casos, la célula es una célula madre hematopoyética. En algunos casos, la célula es una célula T (por ejemplo, una célula T con un receptor de células T (TCR) diseñado, por ejemplo, una célula T de receptor de antígeno quimérico (CAR).

También se describen procedimientos de imagen. En algunos casos, el procedimiento incluye poner en contacto las células que expresan PD-L1 (por ejemplo, in vitro, ex vivo, in vivo) con un polipéptido PD-1 de alta afinidad en cuestión. En algunos casos, dicho contacto comprende administrar el polipéptido PD-1 de alta afinidad a un individuo. En algunos casos, el procedimiento es un procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer en un individuo. Por lo tanto, en algunos casos, la imagen se utiliza para diagnosticar y/o pronosticar cáncer en un individuo.

También se describen procedimientos para inhibir la interacción de PD-1 en una primera célula con PD-L1 y/o PD-L2 en una segunda célula. En algunos casos, el procedimiento incluye poner en contacto la segunda célula con un polipéptido PD-1 de alta afinidad. En algunos casos, la segunda célula es una célula cancerosa o una célula infectada crónicamente. En algunos casos, el contacto tiene lugar in vitro. En algunos casos, el contacto es ex vivo (por ejemplo, una o más células pueden ser autólogas para un individuo en el que se introducirán una o más células). En algunos casos, el contacto tiene lugar in vivo. En algunos casos, el procedimiento incluye poner en contacto la segunda célula con un agente seleccionado de entre: un estimulante inmune, un agente para tratar infecciones crónicas, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un anticuerpo específico de células, un anticuerpo selectivo para un marcador de células tumorales, y una célula T con un receptor de células T diseñado (TCR). En algunos casos, el procedimiento incluye poner en contacto la segunda célula con un anticuerpo específico de tumor.

También hay procedimientos para tratar a un individuo que tiene cáncer, una infección crónica o un trastorno inmunológico asociado con la inmunosupresión. Por ejemplo, los procedimientos pueden incluir administrar al individuo (por ejemplo, en una cantidad efectiva para reducir la unión de PD-1 en una primera célula con PD-L1 en una segunda célula) un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión. En algunos casos, la administración incluye la introducción de un ácido nucleico que codifica el polipéptido mimético PD-1 en una tercera célula. En algunos casos, la tercera célula huésped es in vivo. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido mimético PD-1 se introduce en la tercera célula in vitro o ex vivo, y la tercera célula se introduce a continuación en el individuo. En algunos casos, la tercera célula es una célula inmune. En algunos casos, la célula inmune es una célula T con un receptor de células T diseñado (TCR). En algunos casos, el TCR diseñado es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el individuo tiene un tumor avanzado. En algunos casos, el procedimiento incluye administrar al individuo un agente seleccionado de entre: un estimulante inmune, un agente para tratar infecciones crónicas, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un anticuerpo específico de células, un anticuerpo selectivo para un marcador de células tumorales, y una célula T con un receptor de células T diseñado (TCR).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se entiende mejor a partir de la descripción detallada a continuación cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se expanden o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras. Los polipéptidos de la invención también pueden ser referidos de aquí en adelante como 'polipéptido mimético'.

Fig. 1A-1B. (Fig. 1A) Esquema que ilustra PD-L1 en la superficie de una célula tumoral que se une específicamente a PD-1 en la superficie de una célula T para inhibir la activación de la célula T, permitiendo así que la célula tumoral evada la destrucción por el sistema inmune. **(Fig. 1B)** Esquema que ilustra un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión que se une específicamente a PD-L1 en la superficie de una célula cancerosa, reduciendo así la capacidad de la célula cancerosa para inhibir la activación de las células T, que a su vez reduce la capacidad de la célula con cáncer de evadir la respuesta inmune.

Figuras 2A-2B. (Fig. 2A) Representación estructural de la interacción de PD-1 (arriba a la derecha) con PD-L1 (abajo a la izquierda). Los residuos de PD-1 ubicados en el sitio de contacto con PD-L1 se representan como esferas. **(Fig. 2B)** Se mutagenizó un polipéptido mimético PD-1 (que comprende residuos de aminoácidos naturales) en los residuos que contactan a PD-L1 para generar una biblioteca de primera generación (Generación 1), que fue exhibido en levadura. Las selecciones basadas en la unión se realizaron a continuación usando PD-L1 humana biotinilada (100 nM). Se creó una biblioteca de segunda generación (Generación 2) que se centró en posiciones convergentes para detectar polipéptidos miméticos PD-1 que tienen una afinidad aún mayor por PD-L1 (usando PD-L1 humana biotinilada 1 nM).

Fig. 3 La tabla refleja las secuencias de las variantes diseñadas (polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en

cuestión). Las variantes "G1" son de la Generación 1, mientras que las variantes "G2" son de la Generación 2 (ver Fig. 2A-2B). Cada columna numerada representa la posición de aminoácidos para cada residuo mostrado en relación con el polipéptido PD-1 expuesto SEQ ID NO: 2 (El polipéptido de SEQ ID NO: 2 es un polipéptido mimético PD-1 que incluye una secuencia de PD-1 natural, pero carece de un dominio transmembrana y carece de los primeros 25 aminoácidos de PD-1 natural). La divergencia del residuo de aminoácido natural se indica con el código de una letra única para la mutación resultante para cada variante. La afinidad de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) medida para PD-L1 se indica (cuando se mide) a la derecha. HAC: Consenso de Alta Afinidad. **Fig. 4** Se muestran dos gráficos representativos de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS). La vida media de disociación para un polipéptido mimético PD-1 nativo (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) fue inferior a un segundo. Por el contrario, la vida media de disociación para una variante de PD-1 consenso de alta afinidad HAC-1 (un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión) fue de 42,4 minutos.

Fig. 5A-5C. Polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión potente y específicamente antagonizan PD-L1. Levadura que muestra: (**Fig. 5A**) PD-L1 humana, (**Fig. 5B**) PD-L2 humana, o (**Fig. 5C**) PD-L1 de ratón, se tiñeron con tetrámeros de estreptavidina del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado (un polipéptido mimético PD-1 de control que tiene secuencias PD-1 humanas naturales y conjugado con Alexa647). La unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado a PD-L1 se compitió con concentraciones variables de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad no etiquetados (concentraciones indicadas en el eje x). (**Fig. 5A**) Un polipéptido mimético PD-1 nativo no etiquetado (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) antagonizó la interacción de PD-1/PD-L1. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad (HAC-V PD-1, G2 4-1 y G2 4-2) antagonizaron poderosamente la interacción de PD-1/PD-L1. (**Fig. 5B**) Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad no demostraron ningún antagonismo de la interacción de PD-1:PD-L2, mientras que un polipéptido mimético PD-1 nativo antagonizó la interacción de PD-1:PD-L2. (**Fig. 5C**) Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión también pudieron competir por la unión a PD-L1 de ratón.

Fig. 6A-6B. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad antagonizan la PD-L1 en células cancerosas humanas (**Fig. 6A**) Expresión de PD-L1 en la línea celular de melanoma humano SKMEL28. La expresión de PD-L1 fue inducida en células SKMEL28 por estimulación con 2000 U/mL de interferón gamma humano (IFN γ) durante 24 horas. La tinción de PD-L1 se evaluó mediante citometría de flujo en condiciones inducidas (más IFN γ) versus no inducidas (menos IFN γ). (**Fig. 6B**) Las células SKMEL28 estimuladas con IFN γ se tiñeron con tetrámeros de estreptavidina del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado (un polipéptido mimético PD-1 de control que tiene secuencias PD-1 humanas naturales y se conjuga con Alexa647) con concentraciones variables de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad sin etiquetar (concentraciones indicadas en el eje x). Un polipéptido mimético PD-1 nativo no etiquetado (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) fue ineficaz para impedir la unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado a las células SKMEL28 (IC₅₀ = 8,2 μ M). Por el contrario, HAC-V (un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) inhibió de manera potente la unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado (IC₅₀ de 210 pM). HAC-MBH (HAC-V, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad, fusionado con el dominio CH3 de la IgG1 humana) inhibió la unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado con potencia adicionalmente mejorada (IC₅₀ de 55 pM).

Fig. 7A-7C. Evolución dirigida de PD-1 de alta afinidad con visualización superficial de levadura. (**Fig. 7A**) Modelo de hPD-1 complejado con hPD-L1 construido por alineación estructural de mPD-1:hPD-L1 complejo (PDB ID 3BIK) con hPD-1 (PDB ID 3RRQ). Los residuos aleatorizados de PD-1 se representan como "esferas azules" para los residuos de contacto PD-L1 y "esferas rojas" para los residuos centrales. (**Fig. 7B**) Superposiciones de histograma que evalúan la tinción de hPD-L1 con levadura en cada ronda de selección. Para las selecciones de primera generación (panel izquierdo), todas las rondas se tiñeron con hPD-L1 biotinilado 100 nM. Para las selecciones de segunda generación (panel derecho), la levadura se tiñó con hPD-L1 biotinilado 1 nM. (**Fig. 7C**) Resumen de secuencias y afinidades de hPD-L1 para variantes de PD-1 seleccionadas. La posición de cada posición mutada y el residuo correspondiente en PD-1 natural se indica en la parte superior de la tabla. La fuente en cursiva indica mutaciones que ocurrieron en sitios no aleatorios. Los residuos indicados como 39, 41, 43, 45, 49, 53, 97 y 107 son posiciones de contacto PD-L1 que convergieron en la secuencia de consenso HAC ("Sitios de consenso de contacto"), mientras que los residuos indicados como 40 y 100 son posiciones de centros convergentes ("Sitios de consenso central"). Las afinidades para algunas secuencias con hPD-L1 se determinaron (como se indica, en la columna de la derecha) por Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS).

Fig. 8A-8B. HAC-PD-1 se une y antagoniza PD-L1 humana y murina, pero no PD-L2. (**Fig. 8A**) Sensores representativos de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) de PD-1 natural (izquierda) y HAC-V PD-1 (derecha) que se unen a hPD-L1 inmovilizado. (**Fig. 8B**) Ensayos de unión competitiva de hPD-1, HAC-V PD-1 naturales o 'microcuerpo' HAC (HACmb) en células SK-MEL-28 humanas (izquierda), células B16-F10 de ratón, o levadura que muestra hPD-L2. 100 nM hPD-1/estreptavidina-AlexaFluor tetrámero 647 se usó como ligando sonda. Las barras de error representan el e.e.m.

Fig. 9A-9D. HAC-PD-1 produce una penetración tumoral mejorada y no agota las células T periféricas. (**Fig. 9A**) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de tumores CT26 seccionados deficientes en PD-L1 (*arriba*) o transgénicos para hPD-L1 (*abajo*) cuatro horas después de la inyección intraperitoneal de anti-hPD-L1-

AlexaFluor488 (verde cuando se presenta en color) y HAC-AlexaFluor 594 (rojo cuando se presenta en color). Los núcleos (azul cuando se presentan en color) se etiquetaron con DAPI. Las barras de escala representan 500 μm . **(Fig. 9B)** Citometría de flujo representativa de tumores disociados de la **Fig. 9A** que muestra la tinción relativa HAC-AlexaFluor 594 frente a la tinción anti-hPD-L1-AlexaFluor 488. Los porcentajes se dan en cada cuadrante positivo. **(Fig. 9C)** Resumen de estudios de citometría de flujo de 4 tumores deficientes en PD-L1 y 4 tumores transgénicos hPD-L1. n.s., no significativo. *******, $p < 0,0001$, ANOVA bidireccional. Las barras de error representan el e.e.m. **(Fig. 9D)** Abundancia relativa de células T CD8+ periféricas (*panel más a la izquierda*), células T CD4+ periféricas (*segundo panel desde la izquierda*), células T CD8+ de ganglios linfáticos (*segundo panel desde la derecha*) y Células T CD4+ de ganglios linfáticos (*panel más a la derecha*) después de 3 días de administración de vehículo (PBS), anti-mPD-L1 o HACmb a ratones injertados con tumores CT26. n.s., no significativo *, $p < 0,05$; *******, $p < 0,001$, ANOVA unidireccional.

Fig. 10A-10D. Eficacia antitumoral de los anticuerpos HACmb y anti-PD-L1 en modelos tumorales singénicos CT26 pequeños y grandes. **(Fig. 10A)** Esquema que ilustra el diseño experimental del experimento de tumor pequeño. El tratamiento se inició para todas las cohortes 7 días después del injerto de tumores. Los ratones fueron injertados con dosis diarias de vehículo (PBS), 250 μg de anti-PD-L1 (clon 10F.9G2) o 250 μg de HACmb durante 14 días. **(Fig. 10B)** Tasas de crecimiento relativo de los tumores injertados, calculados como tasa de cambio de lo mostrado para tumores individuales (*tres paneles a la izquierda*) o como datos de resumen (*panel más a la derecha*) durante el transcurso del periodo de tratamiento. Las barras de error representan e.e.m. n.s., no significativo. *******, $p < 0,0001$. **(Fig. 10C)** Esquema que ilustra el diseño experimental del experimento de tumores grandes. Los ratones fueron injertados con tumores CT26 y monitoreados diariamente. Cuando un tumor individual excedió los 150 mm^3 , el ratón fue aleatorizado a una cohorte de tratamiento. Los tumores se midieron diariamente y recibieron tratamiento diario con vehículo (PBS), 250 μg de anti-PD-L1 (clon 10F.9G2) o 250 μg de HACmb durante 14 días. Anti-CTLA4 (clon 9D9) fue administrado como una dosis única de 250 μg . **(Fig. 10D)** Resumen de datos para el crecimiento tumoral promedio durante el periodo de tratamiento de 14 días. Las barras de error representan el e.e.m. El crecimiento tumoral tratado con PBS (negro) y el crecimiento tumoral tratado con anti-CTLA4 (púrpura) en los paneles izquierdo y derecho son idénticos; están representados dos veces para mayor claridad. n.s., no significativo. *******, $p < 0,001$, ANOVA bidireccional. El análisis estadístico completo en el día 14 después del tratamiento se muestra en la Tabla 4.

Fig. 11A-11B. Imagen microTEP de hPD-L1 con ^{64}Cu -DOTA-HAC. **(Fig. 11A)** Imágenes TEP-TC una hora después de la inyección de ^{64}Cu -DOTA-HAC (230 $\mu\text{Ci}/25\mu\text{g}/200\mu\text{l}$) en ratones NSG con tumores subcutáneos hPD-L1 (+) o hPD-L1 (-) CT26. El bloqueo se realizó con 500 $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ de HAC-PD1 sin etiquetar, 2 horas antes del trazador TEP. T-tumor, L-hígado, K-riñones, B-vejiga, SG-glándulas salivales. **(Fig. 11B)** Cuantificación de la captación tumoral una hora después de la inyección por análisis de la región de interés (ROI), indicado como un porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g). *, $p < 0,05$.

Fig. 12A-12B. Diseño de la biblioteca de PD-1 de "Primera Generación". **(Fig. 12A)** La tabla de posiciones aleatorias de hPD-1 se proporciona en la tabla, con el correspondiente codón degenerado y los posibles aminoácidos potenciales en cada sitio. **(Fig. 12B)** Representación estructural de la biblioteca de "Primera generación"; hPD-1 está en verde (cuando se presenta en color) con cadenas laterales aleatorias indicadas como esferas que llenan espacios.

Fig. 13A-13B. Diseño de la biblioteca de PD-1 de "Segunda Generación". **(Fig. 13A)** La tabla de posiciones aleatorias de hPD-1 se proporciona en la tabla, con el codón degenerado correspondiente y los posibles aminoácidos potenciales en cada sitio **(Fig. 13B)** Representación estructural de la biblioteca de "Segunda generación"; hPD-1 está en verde (cuando se presenta en color) con cadenas laterales aleatorias indicadas como esferas que llenan espacios.

Fig. 14 Diagrama esquemático del diseño de "microcuerpo" de HAC (HACmb) en comparación con el monómero HAC PD-1 individual y el anticuerpo anti-PD-L1. HACmb se fusiona con HAC-V al dominio CH3 de IgG1 humana unida por una secuencia bisagra que contiene disulfuro.

Fig. 15A-15B. Tinción *in vitro* e *in vivo* de células que expresan hPD-L1. **(Fig. 15A)** Gráfico FACS de CT26-Tg (hPD-L1)- Δ (mPDL1) sin teñir, teñido con monómero HAC etiquetado con AlexaFluor594 o con anticuerpo anti-PD-L1 etiquetado con AlexaFluor488 (clon 29E.2A3, Biolegend). **(Fig. 15B)** Sección histológica tomada del mismo tumor como se muestra en la Fig. 9A, pero desde el centro del tumor en lugar de en la periferia. La imagen es de tumores disecados cuatro horas después de la inyección intraperitoneal de anti-hPD-L1-Alexa Fluor488 (verde cuando se presenta en color) y HAC-Alexa Fluor 594 (rojo cuando se presenta en color). Los núcleos (azul cuando se presentan en color) se etiquetaron con DAPI. Las barras de escala representan 500 μm .

Fig. 16 Expresión de PD-L1 en células T primarias de sangre periférica en ratones injertados con CT26. Gráfico de puntos que muestra el porcentaje de células T CD4+ PD-L1 positivas y células T CD8+ en la sangre periférica de huéspedes Balb/c 14 días después del injerto con tumores CT26 subcutáneos.

Fig. 17A-17B. Validación del trazador DOTA-HAC TEP. **(Fig. 17A)** Ensayos de unión competitiva de hPD-1, HAC-V o DOTA-HAC naturales en células SK-MEL-28 humanas. Se usó 100 nM de tetrámero hPD-1/estreptavidina-Alexa Fluor 647 como ligando sonda. Las barras de error representan el e.e.m. **(Fig. 17B)** Inmunoreactividad del

radiotrazador anti-hPD-L1. Células hPD-L1(+), hPD-L1 (-) y hPD-L1(+) bloqueadas con exceso de HAC-N91 C antes de la adición del trazador se analizaron para determinar la especificidad de unión. 5 nM ⁶⁴Cu-DOTA-HAC fácilmente unido a células hPD-L1(+) (80,5 % ± 1,9 %), mientras que las células hPD-L1(-) de control solo exhibieron inmunoreactividad mínima (8,3 % ± 0,5 %). La unión fue bloqueada en células hPD-L1(+) mediante la adición de HAC-N91C a 1 μM (8,9 % ± 0,1 %). n.s., no significativo. ****, p < 0,0001, ANOVA bidireccional.

Fig. 18A-18E. Dinámica de imágenes ⁶⁴Cu-DOTA-HAC MicroTEP. **(Fig. 18A)** Captación de tumor calculada por análisis de región de interés (ROI) durante 24 horas. **(Fig. 18B)** Captación renal en ratones portadores de tumores hPD-L1 (+) y (-) evaluados por análisis de ROI. **(Fig. 18C)** Imagen TEP-TC 24 horas después de la inyección de ⁶⁴Cu-DOTA-HAC (230μCi/25μg/200μl) en ratones NSG con tumores CT26 dobles subcutáneos hPD-L1(+) (discontinuo) y hPD-L1 (-) (sólido). **(Fig. 18D)** Captación tumoral calculada por región de interés (ROI). **(Fig. 18E)** Remoción renal durante 24 h. Valores de captación dados como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g).

Figuras 19A-19B. Biodistribución de 24 horas de ⁶⁴Cu-DOTA-HAC. **(Fig. 19A)** Después de completar imágenes micro-TEP/TC, los ratones fueron sacrificados y disecados para biodistribución. La captación en los órganos y tejidos indicados se dan como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. (%ID/g). **(Fig. 19B)** Cantidad relativa de captación de radiotrazadores tumorales hPD-L1(+) en comparación con la sangre y los músculos.

Fig. 20A-20E. Representación esquemática de ejemplos de construcciones de vectores virales que codifican un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión, así como (i) un TCR heterólogo (que se une a un antígeno) (por ejemplo, codifica los polipéptidos TCR-alfa y TCR-beta) o (ii) un receptor de antígeno quimérico (CAR). La figura 20A proporciona una leyenda para las Figs. 20B-20E.

Fig. 21A-21D. Representación esquemática de ácidos nucleicos de ejemplo (vectores de ADN) que codifican un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad y procedimientos para su uso. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad son variantes de secuencias de una proteína PD-1 natural (por ejemplo, la proteína PD-1 humana natural), y tienen utilidad para procedimientos *in vivo* e *in vitro* que bloquean la interacción entre una proteína PD-1 natural y su ligando PD-L (PD-L1 y/o PD-L2). Un polipéptido PD-1 de alta afinidad incluye al menos un cambio de aminoácidos en relación con una proteína PD-1 natural, tiene una afinidad aumentada por PD-L (PD-L1 y/o PD-L2) en relación con la proteína PD-1 natural, y carece de un dominio transmembrana de una proteína PD-1 natural. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una mayor afinidad pueden localizarse en las posiciones de contacto de aminoácidos entre PD-1 y PD-L, y/o puede ubicarse en el dominio de inmunoglobulina de la proteína PD-1 de la que se deriva.

Cuando se describe un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, en relación con la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo, también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo donde cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también están abarcados dentro de la invención, sujetos 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 de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención también se pueden usar en la práctica o pruebas de la presente invención, algunos procedimientos y materiales potenciales y preferidos se describen ahora.

Tal como resultará evidente para un experto en la materia al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en esta invención tienen componentes y características discretas que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las otras realizaciones. Cualquier procedimiento enumerado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Cabe señalar que tal como se usa en esta invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el péptido" incluye referencia a uno

o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Definiciones

- 5 En la descripción que sigue se utilizan varios términos utilizados convencionalmente en el campo. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, y el alcance que debe darse a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.
- 10 Los términos "inhibidores", "agentes de bloqueo" y "agentes de enmascaramiento" de la interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1 se refieren a moléculas que impiden la unión de PD-1 y PD-L1. Para fines de desarrollo, la unión se puede realizar en condiciones experimentales, por ejemplo, usando proteínas aisladas como compañeros de unión, usando porciones de proteínas como compañeros de unión, usando muestras de levadura de proteínas o porciones de proteínas como compañeros de unión, y similares.
- 15 Para fines fisiológicamente relevantes, la unión de PD-1 y PD-L1 suele ser un evento entre dos células, donde cada célula expresa uno de los compañeros de unión. En algunos casos, PD-1 se expresa en la superficie de células inmunes (p. ej., células T), y PD-L1 se expresa en células que podrían ser dianas para destrucción por el sistema inmune (p. ej., células tumorales, células que albergan una infección como una infección crónica y similares). Los
- 20 inhibidores pueden identificarse usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la unión o señalización del receptor o ligando.
- Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en esta invención para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como
- 25 también a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.
- El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y no natural, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados según el código genético, así como también los aminoácidos que se
- 30 modifican posteriormente, p. ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, *es decir*, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, *por ejemplo*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio metílico de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (*p. ej.*, norleucina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica
- 35 que un aminoácido natural. miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.
- Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", se usan indistintamente en esta invención y se
- 40 refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente humanos. "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. En algunas realizaciones, el mamífero es humano.
- 45 Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en esta invención para referirse a células que exhiben un crecimiento autónomo y no regulado, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación celular. Las células de interés para detección, análisis o tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (*por ejemplo*, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente todos los tejidos.
- 50 La frase "carga de cáncer" se refiere a la cantidad de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. Por consiguiente, reducir la carga de cáncer se refiere a reducir el número de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. El término "célula cancerosa", como se usa en esta invención, se refiere a cualquier célula que es una célula cancerosa o se deriva de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la materia conocen muchos tipos de cánceres, incluidos los tumores sólidos como carcinomas, sarcomas,
- 55 glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres circulantes como las leucemias.
- Como se usa en esta invención, "cáncer" incluye cualquier forma de cáncer, incluidos, entre otros, cánceres de tumor sólido (por ejemplo, pulmón, próstata, mama, vejiga, colon, ovario, páncreas, riñón, hígado, glioblastoma, meduloblastoma, leiomiomasarcoma, carcinomas de células escamosas de la cabeza y del cuello, melanomas, neuroendocrinos; etc.) y cánceres líquidos (p. ej., cánceres hematológicos); carcinomas tumores de tejidos blandos;
- 60

sarcomas; teratomas; melanomas; leucemias; linfomas y cánceres cerebrales, que incluyen enfermedad residual mínima, y que incluyen tumores tanto primarios como metastásicos. Cualquier cáncer es un cáncer adecuado para ser tratado por los procedimientos y composiciones en cuestión. En algunos casos, las células cancerosas expresan PD-L1. En algunos casos, las células cancerosas no expresan PD-L1 (por ejemplo, en tales casos, las células del sistema inmune del individuo que se está tratando expresan PD-L1).

Los carcinomas son tumores malignos que se originan en los tejidos epiteliales. Las células epiteliales cubren la superficie externa del cuerpo, recubren las cavidades internas y forman el revestimiento de los tejidos glandulares. Los ejemplos de carcinomas incluyen, entre otros: adenocarcinoma (cáncer que comienza en las células glandulares (secretoras)), por ejemplo, los cánceres de mama, páncreas, pulmón, próstata y colon pueden ser adenocarcinomas; carcinoma adrenocortical; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células renales; carcinoma de ovario; carcinoma in situ; carcinoma ductal; carcinoma de mama; carcinoma de células basales; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células de transición; carcinoma de colon; carcinoma nasofaríngeo; carcinoma de células renales quístico multilocular; carcinoma de células de avena; carcinoma de pulmón de células grandes; carcinoma de pulmón de células pequeñas; carcinoma de pulmón de células no pequeñas; y similares. Los carcinomas se pueden encontrar en próstata, páncreas, colon, cerebro (generalmente como metástasis secundarias), pulmón, mama, piel, etc.

Los tumores de tejidos blandos son un grupo muy diverso de tumores raros que se derivan del tejido conectivo. Los ejemplos de tumores de tejidos blandos incluyen, entre otros: sarcoma alveolar de partes blandas; histiocitoma fibroso angiomasoide; fibroma condromioides; condrosarcoma esquelético; condrosarcoma mixoide extraesquelético; sarcoma de células claras; tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor del estroma endometrial; sarcoma de Ewing; fibromatosis (desmoide); fibrosarcoma infantil; tumor del estroma gastrointestinal; tumor óseo de células gigantes; tumor de células gigantes tenosinoviales; tumor miofibroblástico inflamatorio; leiomioma uterino; leiomiomasarcoma; lipoblastoma; lipoma típico; lipoma de células fusiformes o pleomorfo; lipoma atípico; lipoma condroide; liposarcoma bien diferenciado; liposarcoma mixoide/de células redondas; liposarcoma pleomórfico; histiocitoma fibroso maligno mixoide; histiocitoma fibroso maligno de alto grado; mixofibrosarcoma; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos; mesotelioma; neuroblastoma; osteocondroma; osteosarcoma; tumor neuroectodérmico primitivo; rhabdomyosarcoma alveolar; rhabdomyosarcoma embrionario; schwannoma benigno o maligno; sarcoma sinovial; Tumor de Evan; fascitis nodular; fibromatosis de tipo desmoide; tumor fibroso solitario; dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP); angiosarcoma; hemangioendotelioma epitelioide; tumor de células gigantes tenosinoviales (TGCT); sinovitis villonodular pigmentada (PVNS); displasia fibrosa; mixofibrosarcoma; fibrosarcoma; sarcoma sinovial; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos; neurofibroma; y adenoma pleomórfico de tejidos blandos; y neoplasias derivadas de fibroblastos, miofibroblastos, histiocitos, células vasculares/células endoteliales y células de la vaina nerviosa.

Un sarcoma es un tipo raro de cáncer que surge en las células de origen mesenquimatoso, por ejemplo, en los huesos o en los tejidos blandos del cuerpo, incluidos los cartílagos, las grasas, los músculos, los vasos sanguíneos, los tejidos fibrosos u otros tejidos conectivos o de soporte. Los diferentes tipos de sarcoma se basan en el lugar donde se forma el cáncer. Por ejemplo, el osteosarcoma se forma en los huesos, el liposarcoma en las grasas y el rhabdomyosarcoma en los músculos. Los ejemplos de sarcomas incluyen, entre otros: tumor de Askin; sarcoma botrioides; condrosarcoma; sarcoma de Ewing; hemangioendotelioma maligno; schwannoma maligno; osteosarcoma; y sarcomas de tejidos blandos (p. ej., sarcoma alveolar de partes blandas; angiosarcoma; cistosarcoma filodes; dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP); tumor desmoide; tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; sarcoma epitelioide; condrosarcoma extraesquelético; osteosarcoma extraesquelético; fibrosarcoma; tumor estromal gastrointestinal (GIST); hemangiopericitoma; hemangiosarcoma (más comúnmente conocido como "angiosarcoma"); sarcoma de Kaposi; leiomiomasarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos (MPNST); neurofibrosarcoma; sarcoma sinovial; sarcoma pleomórfico indiferenciado, y similares).

Un teratoma es un tipo de tumor de células germinales que puede contener varios tipos diferentes de tejido (por ejemplo, puede incluir tejidos derivados de cualquiera y/o las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo), que incluyen, por ejemplo, cabello, músculos y huesos. Los teratomas se producen con mayor frecuencia en los ovarios en las mujeres, los testículos en los hombres y el coxis en los niños.

El melanoma es una forma de cáncer que comienza en los melanocitos (células que producen el pigmento melanina). Puede comenzar en un lunar (melanoma de la piel), pero también puede comenzar en otros tejidos pigmentados, como los ojos o los intestinos.

Las leucemias son cánceres que comienzan en el tejido formador de sangre, como la médula ósea, y hacen que se produzca un gran número de células sanguíneas anormales que ingresan al torrente sanguíneo. Por ejemplo, las leucemias pueden originarse en células derivadas de la médula ósea que normalmente maduran en el torrente

sanguíneo. Las leucemias reciben su nombre por la rapidez con que se desarrolla y progresa la enfermedad (p. ej., aguda versus crónica) y por el tipo de glóbulos blancos afectados (p. ej., mieloides versus linfoides). Las leucemias mieloides también se denominan leucemias mielógenas o mieloblásticas. Las leucemias linfoides también se llaman leucemia linfoblástica o linfocítica. Las células de leucemia linfocítica pueden acumularse en los ganglios linfáticos, que pueden inflamarse. Ejemplos de leucemias incluyen, sin limitación: leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielocítica crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

Los linfomas son cánceres que comienzan en las células del sistema inmune. Por ejemplo, los linfomas pueden originarse en células derivadas de la médula ósea que normalmente maduran en el sistema linfático. Hay dos categorías básicas de linfomas. Un tipo es el linfoma de Hodgkin (LH), que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula llamada célula de Reed-Sternberg. Actualmente hay 6 tipos reconocidos de LH. Los ejemplos de linfomas de Hodgkin incluyen: esclerosis nodular, linfoma de Hodgkin clásico (LHC), LHC de celularidad mixta, LHC de agotamiento de linfocitos, LHC rico en linfocitos y LH predominante de linfocitos nodulares.

La otra categoría de linfoma es el linfoma no Hodgkin (LNH), que incluye un grupo grande y diverso de cánceres de células del sistema inmune. Los linfomas no Hodgkin se pueden dividir en cánceres que tienen un curso indolente (crecimiento lento) y aquellos que tienen un curso agresivo (crecimiento rápido). Actualmente hay 61 tipos reconocidos de LNH. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin incluyen, pero no se limitan a: linfomas relacionados con el SIDA, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angioinmunoblástico, linfoma de células NK blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma tipo Burkitt (linfoma de células pequeñas no escindidas), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células T cutáneas, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma folicular, linfomas hepatoesplénicos de células T gamma-delta, leucemias de células T; linfoma linfoblástico; linfoma de células del manto; linfoma de zona marginal; linfoma de células T nasales; linfoma pediátrico; linfomas de células T periféricas, linfoma primario del sistema nervioso central; linfomas transformados; linfomas de células T relacionados con el tratamiento y macroglobulinemia de Waldenstrom.

Los cánceres cerebrales incluyen cualquier cáncer de los tejidos del cerebro. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, entre otros: gliomas (p. ej., glioblastomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y similares), meningiomas, adenomas pituitarios, schwannomas vestibulares, tumores neuroectodérmicos primitivos (meduloblastomas), etc.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, como los ganglios linfáticos, etc.

Como se usa en esta invención, los términos "recurrencia del cáncer" y "recurrencia tumoral", y variantes gramaticales de los mismos, se refieren al crecimiento adicional de células neoplásicas o cancerosas después del diagnóstico de cáncer. Particularmente, puede producirse recurrencia cuando se produce un mayor crecimiento de células cancerosas en el tejido canceroso. La "diseminación tumoral", de manera similar, se produce cuando las células de un tumor se diseminan en tejidos u órganos locales o distantes; por lo tanto, la diseminación tumoral abarca la metástasis tumoral. La "invasión tumoral" se produce cuando el crecimiento tumoral se disemina localmente para comprometer la función de los tejidos involucrados al comprimir, destruir o impedir la función normal de los órganos.

Como se usa en esta invención, el término "metástasis" se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o parte del cuerpo, que no está directamente conectado al órgano del tumor canceroso original. Se entenderá que metástasis incluye micrometástasis, que es la presencia de una cantidad indetectable de células cancerosas en un órgano o parte del cuerpo que no está directamente conectada al órgano del tumor canceroso original. La metástasis también se puede definir como varias etapas de un procedimiento, como la salida de las células cancerosas del sitio original del tumor y la migración. y/o invasión de células cancerosas a otras partes del cuerpo.

El término "muestra" en relación con el paciente abarca muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su adquisición, como por ejemplo con tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones celulares, como las células cancerosas. La definición también incluye muestras que se han enriquecido para tipos particulares de moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, etc. El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye tejido obtenido por resección quirúrgica, tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea,

sangre, plasma, suero y similares. Una "muestra biológica" incluye una muestra obtenida de la célula cancerosa de un paciente, por ejemplo, una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtienen de la célula cancerosa de un paciente (por ejemplo, un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que
5 comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.

El término "diagnóstico" se usa en esta invención para referirse a la identificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológica, tal como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de mama, cáncer de próstata u otro tipo de cáncer.

10

El término "pronóstico" se usa en esta invención para referirse a la predicción de la probabilidad de progresión de la enfermedad (por ejemplo, muerte o progresión atribuible al cáncer), incluida la recurrencia, la diseminación metastásica del cáncer y la resistencia a fármacos. El término "predicción" se usa en esta invención para referirse al acto de predecir o estimar, basado en la observación, la experiencia o el razonamiento científico. En un ejemplo, un

15 médico puede predecir la probabilidad de que un paciente sobreviva, después de la extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia por un cierto período de tiempo sin recurrencia del cáncer.

Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares, se refieren a la unión preferencial no covalente o covalente a una molécula en relación con otras moléculas o fracciones en una solución o mezcla de reacción (por
20 ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido o epitopo particular en relación con otros polipéptidos disponibles). En algunas realizaciones, la afinidad de una molécula por otra molécula a la que se une específicamente se caracteriza por una K_d (constante de disociación) de 10^{-5} M o menos (por ejemplo, 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, o 10^{-16} M o menos). "Afinidad" se refiere a la fortaleza de unión: una afinidad de unión
25 aumentada se correlaciona con una K_d menor.

El término "miembro de unión específico" como se usa en esta invención se refiere a un miembro de un par de unión específico (es decir, dos moléculas, generalmente dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas, por ejemplo, un primer miembro de unión específico, a través de medios no covalentes se une específicamente a la otra molécula,
30 por ejemplo, un segundo miembro de unión específico).

Los términos "co-administración", "co-administrar" y "en combinación con" incluye la administración de dos o más agentes terapéuticos ya sea simultáneamente, al mismo tiempo o de manera secuencial dentro de límites de tiempo no específicos. En una realización, los agentes están presentes en la célula o en el cuerpo del sujeto al mismo tiempo
35 o ejercen su efecto biológico o terapéutico al mismo tiempo. En una realización, los agentes terapéuticos están en la misma composición o forma de dosificación unitaria. En otra realización, los agentes terapéuticos están en composiciones separadas o formas de dosificación unitarias. En ciertas realizaciones, un primer agente se puede administrar antes de (por ejemplo, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8
40 semanas o 12 semanas antes), simultáneamente a, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un agente terapéutico adicional a un sujeto con necesidad del mismo.

45 Por ejemplo, la "administración concomitante" de un fármaco terapéutico contra el cáncer, un fármaco terapéutico para tratar una infección o un anticuerpo dirigido contra un tumor, con una composición farmacéutica de la presente descripción significa la administración con el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en tal momento que ambos el fármaco/anticuerpo y la composición de la presente descripción tendrán un efecto terapéutico. Dicha administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior
50 administración del fármaco/anticuerpo en relación con la administración de un compuesto de la descripción. Una persona de habilidad ordinaria en la materia no tendría dificultades para determinar el momento apropiado, la secuencia y las dosis de administración para fármacos y composiciones particulares de la presente descripción.

En algunas realizaciones, el tratamiento se logra mediante la administración de una combinación de un polipéptido
55 mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción con otro agente (por ejemplo, un estimulante inmune, un agente para tratar infecciones crónicas, un agente citotóxico, etc.) Una clase ejemplar de agentes citotóxicos son los agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, aldesleucina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol,
60 duocarmicina, etoposida, filgrastim, fludarabina, fluorouracil, gemcitabina, granisetron, hidroxiurea, idarubicina,

ifosfamida, interferón alfa, irinotecan, lansoprazol, levamisol, leucovorin, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetron, paclitaxel (Taxol™), pilocarpina, procloroperazina, rituximab, saproina, tamoxifen, taxol, clorhidrato de topotecán, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina.

5 Otras terapias combinadas incluyen la administración con anticuerpos específicos de células, por ejemplo, anticuerpos selectivos para marcadores de células tumorales, radiación, cirugía, y/o privación hormonal (Kwon y col., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 96: 15074-9, 1999). Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con los procedimientos de la descripción. Varios anticuerpos están actualmente en uso clínico para el tratamiento del cáncer, 10 y otros se encuentran en diferentes etapas de desarrollo clínico. Por ejemplo, hay varios antígenos y anticuerpos monoclonales correspondientes para el tratamiento de tumores malignos de células B. Un antígeno diana es CD20. Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico no conjugado dirigido al antígeno CD20. CD20 tiene un papel funcional importante en la activación, proliferación y diferenciación de células B. El antígeno CD52 es una diana para el anticuerpo monoclonal alemtuzumab, que es indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. CD22 15 es una diana para varios anticuerpos, y recientemente ha demostrado eficacia combinada con toxina en la leucemia de células pilosas resistente a la quimioterapia. Dos nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos a CD20, tositumomab e ibritumomab, se han presentado a la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA). Estos anticuerpos están conjugados con radioisótopos. Alemtuzumab (Campath) se usa en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica; Gemtuzumab (Mylotarg) encuentra uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda; Ibritumomab (Zevalin) 20 encuentra uso en el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Panitumumab (Vectibix) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de colon.

Los anticuerpos monoclonales, incluidas las variantes humanizadas y quiméricas, útiles en los procedimientos de descripción que se han usado en tumores sólidos incluyen, sin limitación, edrecolomab y trastuzumab (herceptin). 25 Edrecolomab se dirige al antígeno 17-1A que se ve en el cáncer de colon y recto, y ha sido aprobado para su uso en Europa para estas indicaciones. Trastuzumab se dirige al antígeno HER-2/neu. Este antígeno se observa en del 25 % al 35 % de los cánceres de mama. Cetuximab (Erbix) también es de interés para su uso en los procedimientos de la descripción. El anticuerpo se une al receptor de EGF (EGFR) y se ha utilizado en el tratamiento de tumores sólidos que incluyen cáncer de colon y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

30 Como tal, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se co-administra con un agente (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a un antígeno distinto de PD-L1 (por ejemplo, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), EGFR, HER2, CD117, C-Met, PTHR2, HAVCR2 (TIM3), etc.) Ejemplos de anticuerpos con CDR que proporcionan una 35 unión específica a un marcador de células cancerosas (y, por lo tanto, se pueden usar en una terapia de combinación (co-administrada con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión) incluyen, pero no se limitan a: CETUXIMAB (se une a EGFR), PANITUMUMAB (se une a EGFR), RITUXIMAB (se une a CD20), TRASTUZUMAB (se une a HER2), PERTUZUMAB (se une a HER2), ALEMTUZUMAB (se une a CD52) y BRENTUXIMAB (se une a CD30).

40 En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se co-administra con una célula T con un receptor de células T diseñado (TCR) (dicha célula también se denomina en esta invención "célula T diseñada por TCR"). Ejemplos adecuados no limitantes de una célula T diseñada por TCR son: (i) una célula T que incluye un receptor de antígeno quimérico (CAR); y (ii) una célula T que incluye un TCR heterólogo que se une a un antígeno tal 45 como un antígeno de cáncer. (Células T diseñadas por TCR se describen con más detalle a continuación en la sección sobre la introducción de ácidos nucleicos).

Un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede co-administrarse con cualquier agente inmunomodulador conveniente (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PD-1, un agonista de CD40, 50 un modulador de 4-1BB (por ejemplo, un agonista de 41BB) y similares). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se co-administra con un inhibidor de BTLA y/o CD160. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se co-administra con un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1.

Como se usa en esta invención, la frase "supervivencia libre de enfermedad" se refiere a la falta de recurrencia tumoral 55 y/o propagación y el destino de un paciente después del diagnóstico, en relación con los efectos del cáncer en la vida del paciente. La frase "supervivencia general" se refiere al destino del paciente después del diagnóstico, a pesar de la posibilidad de que la causa de la muerte en un paciente no se deba directamente a los efectos del cáncer. Las frases, "probabilidad de supervivencia libre de enfermedad", "riesgo de recurrencia" y variantes de las mismas, se refieren a la probabilidad de recurrencia o diseminación tumoral en un paciente posterior al diagnóstico de cáncer, donde la 60 probabilidad se determina según el procedimiento de la descripción.

Como se usa en esta invención, el término "se correlaciona" o "se correlaciona con" y términos similares, se refiere a una asociación estadística entre instancias de dos eventos, donde los eventos incluyen números, conjuntos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los eventos involucran números, una correlación positiva (también denominada en esta invención como "correlación directa") significa que a medida que uno aumenta, el otro también aumenta. Una correlación negativa (también denominada en esta invención como "correlación inversa") significa que a medida que uno aumenta, el otro disminuye.

"Unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el individuo particular a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto(s) activo(s) calculada para producir el(los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación puede estar dictada por (a) las características únicas del(de los) compuesto(s) activo(s) y el(los) efecto(s) terapéutico(s) particular(es) a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la materia de componer dicho(s) compuesto(s) activo(s).

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

Los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y las variaciones gramaticales de los mismos, ya que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a un ser humano sin producir efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad que, cuando se le administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento para esa enfermedad.

El término "célula diana", como se usa en esta invención, se refiere a una célula que es una diana para destrucción por el sistema inmune después de la administración de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión. En algunos casos, la célula diana expresa una proteína PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2). Un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede unirse a una célula diana en virtud de la unión a la proteína PD-L expresada en la superficie de la célula diana. Por lo tanto, el término "célula diana" puede referirse a una célula que expresa PD-L1 porque un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión, al inhibir la interacción entre la célula que expresa PD-L1 y la célula que expresa PD-1, facilita la señalización de PD-1 disminuida en la célula que expresa PD-1.

Sin embargo, una célula diana no necesita expresar PD-L1. En algunos casos, una célula diana (p. ej., una célula infectada, una célula cancerosa, etc.) no expresa PD-L1. En algunos de estos casos, la administración de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión conduce a la estimulación del sistema inmune, lo que conduce a la destrucción de la célula diana.

En algunos casos, una célula diana es una célula "infligida" (por ejemplo, una célula de un individuo "infligido"), donde el término "infligido" se usa en esta invención para referirse a un sujeto con síntomas, una enfermedad, o una enfermedad que puede tratarse con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad. Un individuo "infligido" puede tener cáncer, puede albergar una infección (por ejemplo, una infección crónica), puede tener un trastorno inmunológico (por ejemplo, un trastorno asociado con la inmunosupresión), puede tener un trastorno inflamatorio, y/o puede tener otras afecciones hiperproliferativas, por ejemplo, esclerosis, fibrosis y similares, etc. Las "células infligidas" pueden ser aquellas células que causan los síntomas, la enfermedad o la dolencia. Como ejemplos no limitantes, las células infligidas de un paciente infligido pueden ser células cancerosas, células infectadas, células inflamatorias y similares que expresan PD-L1. En algunos casos, una indicación de que una enfermedad o dolencia se puede tratar con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es que las células involucradas (es decir, las células infligidas, por ejemplo, las células cancerosas, las células infectadas, las células inflamatorias, las células inmunes, etc.) expresan PD-L1. En algunos casos, la célula infligida (p. ej., células cancerosas) no expresa PD-L1, pero la enfermedad (p. ej., cáncer) aún puede tratarse utilizando un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión.

Los términos "tratamiento", "tratar", "tratando" y similares son usados en esta invención para referirse generalmente a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de impedir total o parcialmente una enfermedad o síntoma(s) de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento" abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e

incluye: (a) impedir la enfermedad y/o síntoma(s) de ocurrir en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que aún no ha sido diagnosticado como que lo tiene (b) inhibir la enfermedad y/o síntoma(s), es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el(los) síntoma(s) de la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad. y/o síntoma(s) Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya están infligidos (por ejemplo, aquellos con

5 cáncer, aquellos con una infección, aquellos con un trastorno inmune, etc.), así como aquellos en los que se desea prevención (por ejemplo, aquellos con mayor susceptibilidad al cáncer, aquellos con una mayor probabilidad de infección, aquellos sospechosos de tener cáncer, aquellos sospechosos de albergar una infección, etc.).

Un tratamiento terapéutico es aquel en el que el sujeto está infligido antes de la administración y un tratamiento

10 profiláctico es uno en el que el sujeto no está infligido antes de la administración. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mayor probabilidad de estar infligido o se sospecha que está infligido antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mayor probabilidad de estar infligido o se sospecha que está infligido antes del tratamiento.

15 La palabra "etiqueta", cuando se utiliza en esta invención, hace referencias a una composición o compuesto detectable que está conjugado en forma directa o indirecta a un polipéptido mimético PD-1 en cuestión. La etiqueta se puede detectar por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que se puede detectar.

20 Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la presente descripción. Ejemplos de fases sólidas incluidas en esta invención incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de

25 cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

30 "Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen ambos anticuerpos y otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo pueden, por ejemplo, producirse a bajos niveles por el sistema linfático y a mayores niveles por los mielomas.

35 "Fragmento de anticuerpo" y todas las variantes gramaticales del mismo, como se usa en esta invención, se definen como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, donde la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de

40 anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tenga una estructura primaria que consista en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en esta invención "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), que incluye, entre otros (1) moléculas Fv (scFv) de cadena sencilla; (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR

45 del dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada; (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada y (4) nanocuerpos que comprenden dominios de Ig sencillos de especies no humanas u otros módulos de unión a dominio sencillo específico; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que

50 comprende una o más cadenas pesadas, la(s) cadena(s) pesada(s) puede(n) contener cualquier secuencia de dominio constante (por ejemplo, CH1 en el isotipo IgG) encontrada en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de región bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de la región bisagra o la secuencia de dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s).

55 "Anticuerpos e inmunoglobulinas nativas" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera

60 tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados en intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un

extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo, el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Clothia y col., *J. Mol. Biol.* 186:651 (1985); Novotny y Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82:4592 (1985)).

El término "variable" hace referencia al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres CDR, que forman lazos que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas y próximas mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (ver Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento del antígeno completo. En una especie Fv de cadena doble, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente. En una especie Fv de cadena simple (scFv), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dímera" análoga a aquella en una especie Fv de cadena doble. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero $VH-VL$. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión. Para acceder a una revisión de scFv, ver Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

El fragmento Fab contiene además el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se utiliza en la presente para el Fab' en que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA_1 , IgA_2 . Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan a, d, e, g y m, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Las variantes diseñadas de las subclases de inmunoglobulina, incluidas las que aumentan o disminuyen las funciones efectoras inmunes, la vida media o la estabilidad del suero, también se incluyen en esta terminología.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "conjugado" como se describe y reivindica en esta invención se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpos a una o más moléculas de polímeros, donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir, soluble en fluidos fisiológicos como sangre, y donde la molécula heterogénea está libre de cualquier agregado estructurado. Un conjugado de interés es PEG. En el contexto de la definición anterior, el término "agregado estructurado" se refiere a (1) cualquier agregado de moléculas en solución acuosa que tenga una estructura esferoide o de concha esferoide,

de modo que la molécula heterogénea no esté en una micela u otra estructura de emulsión, y no esté anclada a una bicapa lipídica, vesícula o liposoma; y (2) cualquier agregado de moléculas en forma sólida o insolubilizada, como una matriz de perlas para cromatografía, que no libera la molécula heterogénea en solución al entrar en contacto con una fase acuosa. Por consiguiente, el término "conjugado" como se define en esta invención abarca la molécula
5 heterogénea mencionada anteriormente en un precipitado, sedimento, matriz bioerosionable u otro sólido capaz de liberar la molécula heterogénea en solución acuosa tras la hidratación del sólido.

Como se usa en esta descripción, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones
10 superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Composiciones

15 Se proporcionan polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad y análogos de los mismos, que pueden denominarse genéricamente reactivos PD-1 de alta afinidad. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad son variantes de la proteína PD-1 humana natural. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad, donde el polipéptido carece del dominio transmembrana PD-1 (y puede ser un polipéptido
20 mimético PD-1 de alta afinidad soluble) e incluye al menos un cambio de aminoácido relativo a la secuencia de PD-1 natural, y donde el cambio de aminoácido aumenta la afinidad del polipéptido mimético PD-1 para unirse a PD-L1 (p. ej., disminuyendo la tasa de desactivación en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más).

25 Debe entenderse que cuando un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión carece de un dominio transmembrana PD-1, algunos aminoácidos de un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana PD-1) aún pueden estar presentes (p. ej., algunos aminoácidos de la transmembrana pueden retenerse, siempre que la proteína conserve la función deseada). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es soluble. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión carece de un dominio
30 transmembrana PD-1, pero incluye un dominio transmembrana heterólogo (es decir, un dominio transmembrana forma una proteína distinta de PD-1). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana heterólogo, un dominio transmembrana PD-1, etc.) e incluye un enlazador escindible entre la porción de ectodominio y el dominio transmembrana.

35 Polipéptidos

Un "polipéptido mimético PD-1" como se usa en esta invención se refiere a un polipéptido que tiene la porción de una proteína PD-1 que es suficiente para unirse a PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2) con una afinidad reconocible, pero que carece de un dominio transmembrana (por ejemplo, carece del dominio transmembrana presente de forma natural
40 de una proteína PD-1 natural). Por lo tanto, a diferencia de un polipéptido PD-1 existente de forma natural, un polipéptido mimético PD-1 en cuestión no está permanentemente atado a una membrana celular por medio de un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 en cuestión es soluble. Un dominio extracelular de proteína que normalmente está atado a la membrana plasmática de una célula a veces se conoce en la materia como un ectodominio. Por lo tanto, un polipéptido mimético PD-1 puede considerarse (o derivarse) de un
45 ectodominio de PD-1, o puede considerarse que incluye al menos una porción (o una porción derivada) del ectodominio de un polipéptido PD-1.

Una proteína PD-1 natural tiene un dominio transmembrana, se expresa en la superficie celular y se une específicamente a sus ligandos PD-L (PD-L1 y PD-L2), que también se expresan en la superficie celular. Por lo tanto,
50 una PD-1 natural, expresada en la superficie de una primera célula, se une específicamente a PD-L1 y/o PD-L2, expresada en la superficie de una segunda célula. Una proteína PD-1, a la que corresponde un polipéptido mimético PD-1 (por ejemplo, de la que se deriva un polipéptido mimético PD-1) puede ser cualquier proteína PD-1 (por ejemplo, una proteína PD-1 natural). Las proteínas PD-1 de ejemplo incluyen aquellas de cualquier especie, por ejemplo, una proteína PD-1 de mamífero, una proteína PD-1 de roedor, una proteína PD-1 de primate, una proteína PD-1 de rata,
55 una proteína PD-1 de ratón, una proteína PD-1 de cerdo, una proteína PD-1 de vaca, una proteína PD-1 de oveja, una proteína PD-1 de conejo, una proteína PD-1 de perro, una proteína PD-1 humana, etc. Diversas secuencias de polipéptidos PD-1 naturales (p. ej., caninos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, de roedores, de ratón, de rata, felinos, de primates, monos, simios, chimpancés y similares) se pueden encontrar fácilmente y están fácilmente disponibles para un experto en la materia. Por ejemplo, la proteína PD-1 humana (expuesta como SEQ ID NO: 1) es:

60

PD-1 humana natural

(también conocido como "muerte celular programada 1", PDCD1, CD279, PD1, SLEB2, hPD-1, hPD-I y hSLE1)

MQIQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGYLTCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSA
VPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSAD
5 GPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 1)

negrita: dominio transmembrana - aminoácidos 168-191

subrayado: polipéptido mimético PD-1 nativo ejemplar - aminoácidos 26-147

- 10 Una proteína PD-L es un ligando unido a membrana a PD-1. Hay dos proteínas PD-L humanas a las que se hace referencia en la materia como PD-L1 y PD-L2. Las proteínas PD-L de ejemplo incluyen aquellas de cualquier especie, por ejemplo, una proteína PD-L de mamífero, una proteína PD-L de roedor, una proteína PD-L de primate, una proteína PD-L de rata, una proteína PD-L de ratón, una proteína PD-L de cerdo, una proteína PD-L de vaca, una proteína PD-L de oveja, una proteína PD-L de conejo, una proteína PD-L de perro, una proteína PD-L humana, etc. Diversas
15 secuencias de polipéptidos PD-L naturales (p. ej., caninos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, de roedores, de ratón, de rata, felinos, de primates, monos, simios, chimpancés y similares) se pueden encontrar fácilmente y están fácilmente disponibles para un experto en la materia. Por ejemplo, las proteínas PD-L1 PD-L2 humanas (expuestas como SEQ ID NO: 36-38, respectivamente) son:

20 **PD-L1 humana natural**

(también conocida como "muerte celular programada 1 ligando 1", PDCD1LG1, CD274, B7-H, B7H1, PDL1, PD-L1, PDCD1L1)

25 (Isoforma a)

MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAG
VYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVI
WTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA
ELVIPPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNS
KKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 36)

(Isoforma b)

30

MRIFAVFIFMTYWHLNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS
DHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIP
ELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQS
DTHLEET (SEQ ID NO: 37)

PD-L2 humana natural

- 35 (también conocida como "muerte celular programada 1 ligando 2", PDCD1 LG2, CD273, B7DC, B7DC, PDL2, PDCD1 L2, bA574F11.2)

MIFLLLMLSLELQLHQIAALFTVTPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITAS
 LQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQRDEGQYQCIIYGVAWDYK
 YLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTQCQATGYPLAEVSWPNVSPANTSHSRT
 PEGLYQVTSVLRLKPPPGRNFSCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLL
 HIFIPFCIIAFIFIATVIALRKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI (SEQ ID NO:
 38)

El dominio transmembrana de una PD-1 natural es fácilmente identificable. Como ejemplo ilustrativo, se ejecutaron tres programas de predicción de dominio diferentes en la proteína PD-1 humana natural expuesta en SEQ ID NO: 1, y se determinaron las siguientes regiones de aminoácidos superpuestas para definir un dominio transmembrana: 168-191, 167-189 y 169-191. Por lo tanto, un dominio transmembrana está presente en los aminoácidos 167-191 (por ejemplo, 168-191, 167-189, y/o 169-191) de la proteína PD-1 humana natural expuesta en SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 carece de los aminoácidos 167-191, 168-191, 167-189, y/o 169-191 de la proteína PD-1 humana natural expuesta en SEQ ID NO: 1, o la región correspondiente de otra proteína PD-1 natural. Las secuencias de varios polipéptidos PD-1 natural adicionales (p. ej., caninos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, de roedores, de ratones, de ratas, felinos, de primates, de monos, de simios, de chimpancés y similares) se pueden encontrar fácilmente y están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

Un polipéptido mimético PD-1 adecuado se une específicamente a PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2 en una célula diana, por ejemplo, en una célula cancerosa) y, por lo tanto, reduce (por ejemplo, bloquea, impide, etc.) la interacción entre PD-L y PD-1 (por ejemplo, PD-1 en una célula inmune, por ejemplo, en una célula T). Por lo tanto, un polipéptido mimético PD-1 en cuestión puede considerarse un receptor señuelo diseñado para PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2). Al reducir la interacción entre PD-L y PD-1, un polipéptido mimético PD-1 en cuestión puede disminuir las señales inhibitoras inmunes producidas por la interacción PD-L/PD-1 y, por lo tanto, puede aumentar la respuesta inmune (por ejemplo, al aumentar la activación de las células T).

Un polipéptido mimético PD-1 adecuado comprende la porción de PD-1 que es suficiente para unir PD-L1 a una afinidad reconocible, por ejemplo, alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia de señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad de unión. Por lo tanto, un polipéptido mimético PD-1 en cuestión puede comprender un dominio de inmunoglobulina, o una porción del mismo (como se describe a continuación) que es suficiente para unir PD-L1 con una afinidad reconocible. Un polipéptido mimético PD-1 en cuestión (p. ej., un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) puede comprender porciones de una proteína PD-1 natural que no sea el dominio de inmunoglobulina, incluidos, por ejemplo, aminoácidos contiguos de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 2 y 27-34 (o las secuencias correspondientes de cualquier otra proteína PD-1, por ejemplo, cualquier otra proteína PD-1 de mamífero).

En algunos casos, la porción de PD-1 que es suficiente para unir PD-L1 y/o PD-L2 incluye todo o una parte del dominio de inmunoglobulina de un polipéptido PD-1 natural, que puede ser fácilmente identificado por un experto en la materia. Por ejemplo, una exploración de la secuencia PD-1 humana natural expuesta en SEQ ID NO: 1 revela que la región de los aminoácidos 35-146 contiene un dominio de inmunoglobulina (Tabla 1). Un polipéptido mimético PD-1 (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) puede incluir todo o una parte del dominio de inmunoglobulina de PD-1; y puede comprender además uno o más aminoácidos de PD-1 fuera del dominio de inmunoglobulina; y puede comprender secuencias de aminoácidos distintas de PD-1, que incluyen, sin limitación, secuencias de la región Fc de inmunoglobulina.

Tabla 1 Dominios de inmunoglobulina de PD-1 humana natural identificados por diversos softwares de análisis de secuencia.

| Aminoácidos | Dominio | Base de datos |
|-------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|
| 35-145 | Dominio similar a inmunoglobulina | PROSITE |
| 38-128 | Dominio V-set de inmunoglobulina | Pfam |
| 39-145 | Subtipo de inmunoglobulina | SMART |
| 39-146 | Doblez similar a inmunoglobulina | GENE3D |
| 49-125 | Inmunoglobulina Tipo V (IGv); subgrupo V-set de inmunoglobulina | SMART |

| Aminoácidos | Dominio | Base de datos |
|-------------|------------------------------------------------|---------------|
| 42-136 | IgV; Dominio variable de inmunoglobulina (IgV) | NCBI |
| 39-125 | Similar a IG; similar a inmunoglobulina | NCBI |

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, a la región correspondiente de un polipéptido PD-1 natural) (por ejemplo, un polipéptido PD-1 natural de mamífero; la proteína PD-1 natural humana expuesta en SEQ ID NO: 1, y similares).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a un dominio de inmunoglobulina de un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, un dominio V-set de inmunoglobulina o un dominio Tipo V de inmunoglobulina (dominio IGv); un doblez similar a inmunoglobulina; un dominio variable de inmunoglobulina; un dominio similar a inmunoglobulina y similares). Las secuencias de varios polipéptidos PD-1 natural adicionales (p. ej., caninos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, de roedores, de ratones, de ratas, felinos, de primates, de monos, de simios, de chimpancés y similares) se pueden encontrar fácilmente y están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a una región que contiene un dominio de inmunoglobulina de la secuencia de aminoácidos PD-1 humanos expuesta en SEQ ID NO: 1; o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural (p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a aminoácidos 35-145 (SEQ ID NO: 27), 38-128 (SEQ ID NO: 28), 39-145 (SEQ ID NO: 29), 39-146 (SEQ ID NO: 30), 49-125 (SEQ ID NO: 31), 42-136 (SEQ ID NO: 32), 39-125 (SEQ ID NO: 33), 35-146 (SEQ ID NO: 34), 1-166 (SEQ ID NO: 35), y/o 26-147 (SEQ ID NO: 2) de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-1 humano natural expuesta en SEQ ID NO: 1; o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural (p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye los aminoácidos 35-145, 38-128, 39-145, 39-146, 49-125, 42-136, 39-125, 35-146, 1-166 y/o 26-147 (SEQ ID NO: 2) de la secuencia de la proteína PD-1 humana natural (secuencia de aminoácidos) expuesta en SEQ ID NO: 1; o la región correspondiente de otra proteína PD-1 natural (por ejemplo, otra proteína PD-1 natural de mamífero).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos del polipéptido mimético PD-1 natural expuesta en SEQ ID NO: 2 (es decir, el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2); o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural (p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero). El polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 2 es un fragmento de proteína (aminoácidos 26-147) de la proteína PD-1 humana natural (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 incluye un dominio de inmunoglobulina del polipéptido PD-1 humano natural. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (es decir, los aminoácidos 26-147 de la secuencia de la proteína PD-1 humana expuesta en SEQ ID NO: 1) (es decir, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2); o la región correspondiente de otra proteína PD-1 natural, por ejemplo, otra proteína PD-1 natural de mamífero.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25 (por ejemplo, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia para cualquiera de SEQ ID NO: 3-25, SEQ ID NO: 2-23, SEQ ID NO: 3-23, SEQ ID NO: 24-25, etc.). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25 (por ejemplo, SEQ ID NO: 3-25, SEQ ID NO: 2-23, SEQ ID NO: 3-23, SEQ ID NO: 24-25, etc.).

En esta invención se hace referencia a un polipéptido mimético PD-1 que no tiene mutaciones en relación con la región

correspondiente de una proteína PD-1 natural (es decir, donde el polipéptido mimético PD-1 es un fragmento de una proteína natural) como un "polipéptido mimético PD-1 nativo". Un polipéptido mimético PD-1 nativo puede usarse como control en varios aspectos, por ejemplo, en algunos casos al determinar si un polipéptido mimético PD-1 es un "polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad".

5

Polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad. Un "polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad" es un polipéptido mimético PD-1 (como se definió anteriormente, y por lo tanto carece de un dominio transmembrana de una proteína PD-1 natural) que tiene una mutación de aminoácidos (es decir, un cambio de aminoácido) en relación con una proteína PD-1 natural, (por ejemplo, en relación con la región correspondiente de una proteína PD-1 natural, en relación con el ectodominio de una proteína PD-1 natural, en relación con el dominio de inmunoglobulina de una proteína PD-1 natural, en relación con un polipéptido mimético PD-1 nativo, etc.), donde la mutación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido mimético PD-1 por PD-L1 de modo que la afinidad del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad para PD-L1 es mayor que la afinidad de la proteína PD-1 natural (y/o el polipéptido mimético PD-1 nativo correspondiente) para PD-L1. Por ejemplo, la mutación de aminoácidos puede aumentar la afinidad al disminuir la tasa de desactivación en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más.

Según la presente descripción, las mutaciones (es decir, cambios) de aminoácidos incluyen cualquier modificación de aminoácidos producida de forma natural o artificial conocida o descubierta posteriormente en el campo. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos incluyen, por ejemplo, sustitución, delección, adición, inserción, etc. de uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos incluyen reemplazar un aminoácido existente con otro aminoácido. En realizaciones relacionadas, los cambios de aminoácidos incluyen reemplazar uno o más aminoácidos existentes con aminoácidos no naturales, o insertar uno o más aminoácidos no naturales. Los cambios de aminoácidos pueden realizarse en 1 o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, 20 o más, etc.) residuos de aminoácidos en relación con una secuencia natural. El uno o más cambios de aminoácidos pueden conferir varias propiedades al polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad, por ejemplo, afectando la estabilidad, la actividad de unión y/o especificidad, etc.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, en relación con la región correspondiente de un polipéptido PD-1 natural) (por ejemplo, un polipéptido PD-1 natural de mamífero; la proteína PD-1 natural humana expuesta en SEQ ID NO: 1, y similares).

35

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con el dominio de inmunoglobulina de un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, aminoácidos 35-145, 38-128, 39-145, 39-146, 49-125, 42-136, 39-125, 35-146, 1-166 y/o 26-147 (SEQ ID NO: 2) de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-1 humano natural expuesta en SEQ ID NO: 1; o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con el ectodominio de un polipéptido PD-1 natural.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (que es un "polipéptido mimético PD-1 nativo", como se definió anteriormente); o la región correspondiente de otra proteína PD-1 natural, por ejemplo, otra proteína PD-1 natural de mamífero. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25 (p.ej., en relación con cualquiera de SEQ ID NO: 3-25, SEQ ID NO: 2-23, SEQ ID NO: 3-23, SEQ ID NO: 24-25, etc.).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con

60

un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, en relación con la región correspondiente de un polipéptido PD-1 natural) (por ejemplo, un polipéptido PD-1 natural de mamífero; la proteína PD-1 natural humana expuesta en SEQ ID NO: 1, y semejantes, e incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, a la región correspondiente de un polipéptido PD-1 natural) (por ejemplo, un polipéptido PD-1 natural de mamífero; la proteína PD-1 natural humana expuesta en SEQ ID NO: 1, y similares).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con el dominio de inmunoglobulina de un polipéptido PD-1 natural; o la región correspondiente de otra proteína PD-1 natural, por ejemplo, otra proteína PD-1 natural de mamífero, e incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) al dominio de inmunoglobulina de un polipéptido PD-1 natural (p. ej., aminoácidos 35-145, 38-128, 39-145, 39-146, 49-125, 42-136, 39-125, o 35-146 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-1 humano natural expuesta en SEQ ID NO: 1); o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con los aminoácidos 35-145, 38-128, 39-145, 39-146, 49-125, 42-136, 39-125, 35-146, 1-166 y/o 26-147 (SEQ ID NO: 2) de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-1 humano natural expuesta en SEQ ID NO: 1); o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero; e incluye una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a los aminoácidos 35-145, 38-128, 39-145, 39-146, 49-125, 42-136, 39-125, 35-146, 1-166 y/o 26-147 (SEQ ID NO: 2) de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-1 humano natural expuesta en SEQ ID NO: 1; o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2); o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero; e incluye una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2; o la región correspondiente a otra proteína PD-1 natural, p.ej., otra proteína PD-1 natural de mamífero.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 cambios de aminoácidos) en relación con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25 (por ejemplo, en relación con cualquiera de SEQ ID NO: 3-25, SEQ ID NO: 2-23, SEQ ID NO: 3-23, SEQ ID NO: 24-25, etc.); e incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25 (por ejemplo, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,2 % o más, 99,5 % o más, 99,8 % o más, 99,9 % o más, o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 3-25, SEQ ID NO: 2-23, SEQ ID NO: 3-23, SEQ ID NO: 24-25, etc.).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 14 o más o 15 cambios de aminoácidos) ubicados en las posiciones de aminoácidos de PD-1 que hace contacto con PD-L1. Por ejemplo, en algunos casos, el uno o más (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 14 o más, 15 o más) cambios de aminoácidos se encuentran en una posición de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humano) expuesto en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre: V39, N41, Y43, M45,

S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, P105, K106 y A107; o la posición de aminoácidos correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural. Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción incluye un cambio de aminoácidos (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 14 o más o 15 cambios de aminoácidos) ubicados en una posición de aminoácido en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humana) expuesta en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre: V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, y A107; o la posición de aminoácidos correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural. Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción incluye cambios de aminoácidos ubicados en las posiciones de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humana) expuesta en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre: (a) V39, N41, Y43, M45, S48, N49, Q50, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (b) V39, N41, Y43, M45, S48, Q50, T51, D52F, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (c) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, M83, L97, A100, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (d) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66P, M83, L97, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (e) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66P, H82, M83, L97, A100, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (f) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, M83, L97, A100, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; (g) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, L97, A100, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; y (h) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, L97, A100, y A107, o las posiciones de aminoácidos correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural. Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción incluye uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 14 o más o 15 cambios de aminoácidos) en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humana) expuesta en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre: (1) V39H o V39R; (2) L40V o L40I; (3) N41I o N41V; (4) Y43F o Y43H; (5) R44Y o R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, o M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, o N49S; (9) Q50K, Q50E, o Q50H; (10) T51V, T51L, o T51A; (11) D52F, D52R, D52Y, o D52V; (12) K53T o K53L; (13) A56S o A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V; (16) Q66P; (17) V72I; (18) H82Q; (19) M83L o M83F; (20) R90K; (21) Y96F; (22) L97Y, L97V, o L97I; (23) A100I o A100V; (24) S102T o S102A; (25) L103I, L103Y, o L103F; (26) A104S, A104H, o A104D; (27) P105A; (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T; y (29) A107P, A107I, o A107V; o un cambio que da como resultado el mismo aminoácido en la posición correspondiente en relación con otra proteína PD-1 natural. Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción incluye cambios de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humana) expuesto en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre:

(a) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;

(b) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {T51V, T51L, o T51A}, {D52F, D52R, D52Y, o D52V}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes con respecto a otra proteína PD-1 natural;

(c) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P,

- A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (d) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (e) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {H82Q}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (f) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (g) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (h) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la descripción incluye cambios de aminoácidos, en relación con el fragmento de proteína (de PD-1 natural humana) expuesta en SEQ ID NO: 2 (que es un fragmento de proteína de la proteína PD-1 natural humana), seleccionada de entre:

- (a) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48G, N49Y, Q50E, K53T, A56S, Q63T, G65L, Q66P, L97V, S102A, L103F, A104H, K106V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (b) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48N, Q50H, T51A, D52Y, K53T, A56L, Q63L, G65F, Q66P, L97I, S102T, L103F, A104D, K106R, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (c) V39H, L40V, N41V, Y43H, R44Y, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100I, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (d) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, Q66P, M83L, L97V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (e) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49S, K53T, Q66P, H82Q, M83L, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (f) V39H, L40I, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (g) V39H, L40V, N41I, Y43H, R44L, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural;
- (h) V39H, L40V, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I; o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural; e
- (i) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I o cambios que dan como resultado los mismos aminoácidos en las posiciones correspondientes en relación con otra proteína PD-1 natural. Por ejemplo, consultar **Fig. 3**.

Afinidad

Como el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión tiene una mayor afinidad por PD-L1 en comparación con la afinidad por PD-L1 de una proteína PD-1 natural, y/o en comparación con la afinidad por PD-L1 de un polipéptido mimético PD-1 que no tiene un cambio de aminoácidos en relación con una secuencia correspondiente de un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 nativo, como se definió anteriormente).

En algunas realizaciones, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad tiene una K_d de 1×10^{-7} M o menos (e.g., 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, o 10^{-16} M o menos) para PD-L1. En algunos casos, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad

tiene una afinidad por PD-L1 en un intervalo de 1 fM a 1 μ M (por ejemplo, de 1 fM a 800 nM, de 10 fM a 500 nM, de 100 fM a 100 nM, de 500 fM a 50 nM, de 800 fM a 50 nM, de 1 pM a 50 nM, de 10 pM a 50 nM, de 50 pM a 50 nM, de 100 pM a 50 nM, de 500 fM a 100 nM, de 800 fM a 100 nM, de 1 pM a 100 nM, de 10 pM a 100 nM, de 50 pM a 100 nM, o de 100 pM a 100 nM). En algunos casos, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se une a PD-L1 con una

5 afinidad de 1 μ M o mayor (por ejemplo, 800 nM o mayor, 500 nM o mayor, 200 nM o mayor, 100 nM o mayor, 50 nM o mayor, 10 nM o mayor, 1 nM o mayor, 900 pM o mayor, 750 pM o mayor, 500 pM o mayor, 200 pM o mayor, 100 pM o mayor, 10 pM o mayor, 1 pM o mayor, etc.) (donde la afinidad aumenta con valores decrecientes).

En algunas realizaciones, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad tiene una afinidad por PD-L1 que es 2 veces

10 o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la afinidad por PD-L1 de una proteína PD-1 natural; y/o 2 veces o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la afinidad por PD-L1 de un polipéptido mimético

15 PD-1 que no tiene un cambio de aminoácidos en relación con una secuencia correspondiente de un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 nativo, como se definió anteriormente).

En algunas realizaciones, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad tiene una vida media de disociación por PD-L1 que es 2 veces o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000

20 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la vida media de disociación por PD-L1 de una proteína PD-1 natural; y/o 2 veces o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la vida media de disociación por PD-L1 de un polipéptido mimético PD-1 que no tiene un cambio de aminoácidos en relación con

25 una secuencia correspondiente de un polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 nativo, como se definió anteriormente). Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 nativo (como se definió anteriormente) tiene una vida media de disociación para PD-L1 de menos de 1 segundo, mientras que un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede tener una vida media de disociación de 5 segundos o más (por ejemplo, 30 segundos o más, 1 minuto o más, 5 minutos o más, 10 minutos o más, 20 minutos o más, 30 minutos o más, 40 minutos o más, etc.). Por ejemplo, la mutación de aminoácidos de un polipéptido mimético PD-1 de alta

30 afinidad en cuestión puede aumentar la afinidad al disminuir la tasa de desactivación en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión tiene una afinidad disminuida por PD-L2

35 en comparación con la afinidad por PD-L2 de un polipéptido mimético PD-1 correspondiente que no tiene un cambio de aminoácido relativo al polipéptido PD-1 natural (por ejemplo, una afinidad disminuida por PD-L2 en comparación con la afinidad por PD-L2 de un polipéptido mimético PD-1 nativo correspondiente, como se definió anteriormente).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión tiene una mayor afinidad por PD-L1 que

40 por PD-L2. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se une específicamente a PD-L1, pero no a PD-L2. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión tiene una afinidad por PD-L2 que se caracteriza por una K_d (constante de disociación) que es 2 veces o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la K_d

45 que caracteriza la afinidad del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad por PD-L1. En otras palabras, en algunos casos, la afinidad de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad por PD-L1 puede ser 2 veces o más (por ejemplo, 5 veces o más, 10 veces o más, 100 veces o más, 500 veces o más, 1000 veces o más, 5000 veces o más, 10^4 veces o más, 10^5 veces o más, 10^6 veces o más, 10^7 veces o más, 10^8 veces o más, etc.) mayor que la afinidad del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión por PD-L2.

50 La afinidad para unirse a PD-L1 y/o PD-L2 puede determinarse, por ejemplo, por la capacidad de un polipéptido miméticos PD-1 de alta afinidad para unirse a PD-L1 y/o PD-L2 recubierto en una placa de ensayo; exhibido en una superficie celular microbiana; en solución; etc. La actividad de unión de de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad de la presente descripción a PD-L1 y/o PD-L2 se puede analizar inmovilizando el ligando (p. ej., PD-L1 y/o PD-L2) o

55 el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad a una perla, sustrato, célula, etc. Los agentes pueden agregarse en un tampón apropiado y los compañeros de unión se incuban durante un período de tiempo a una temperatura dada. Después de los lavados para eliminar el material no unido, la proteína unida puede liberarse con, por ejemplo, SDS, tampones con un pH alto y similares y analizarse. Por ejemplo, ver la **Fig. 4**, que representa gráficas de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) (es decir, resultados de experimentos RPS que probaron la capacidad de un

60 polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad para unirse a PD-L1).

La unión también se puede determinar, por ejemplo, midiendo la capacidad de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad no etiquetado para competir con un polipéptido PD-1 etiquetado (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado, como se definió anteriormente) para la unión a PD-L1 (para ejemplos, ver **Fig. 5A-5C** y **Fig. 6A-6B**).

5 Por consiguiente, la unión relativa se puede evaluar comparando los resultados usando un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad candidato sin etiquetar con los resultados usando un polipéptido mimético PD-1 nativo sin etiquetar (como se definió anteriormente, un polipéptido mimético PD-1 que no tiene un cambio de aminoácidos en relación con la secuencia correspondiente de un PD-1 natural).

10 Se puede usar cualquier procedimiento conveniente para generar un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión. Como un ejemplo no limitativo, la mutagénesis se puede realizar (comenzando con un polipéptido mimético PD-1 nativo, o comenzando con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad con el fin de generar un polipéptido con una afinidad aún mayor) para generar colecciones de polipéptidos miméticos PD-1 mutados. La mutagénesis puede ser una diana para producir cambios en aminoácidos particulares, o la mutagénesis puede ser aleatoria. Los

15 polipéptidos miméticos PD-1 mutados pueden ser detectados a continuación por su capacidad para unirse a una proteína PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2). Por ejemplo, una proteína PD-L (o una variante de una proteína PD-L, por ejemplo, una versión que carece de un dominio transmembrana) se puede etiquetar (por ejemplo, con una etiqueta directa como un radioisótopo, una fracción fluorescente, etc.; o con una etiqueta indirecta como un antígeno, una etiqueta de afinidad, biotina, etc.) y a continuación se puede usar para contactar los polipéptidos miméticos PD-1 de

20 alta afinidad candidatos (p. ej., donde los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad candidatos puede unirse a una superficie sólida o mostrarse en la membrana de una célula, por ejemplo, una célula de levadura). Al variar la concentración de PD-L utilizada, se pueden identificar polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad entre los candidatos (es decir, entre la colección de polipéptidos miméticos PD-1 mutados). Ver **Fig. 2A-2B** para un ejemplo no limitante de cómo se puede identificar un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión.

25

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad de la presente descripción es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido (un compañero de fusión). En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se elimine de la circulación rápidamente. Como la penetración en el tejido (es decir, la capacidad de penetrar en los tejidos) puede ser una clara ventaja de usar un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión debido a su tamaño relativamente pequeño (por ejemplo, en comparación con una proteína mucho más grande como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L), en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad no se fusiona con un segundo polipéptido, o se fusiona con un segundo polipéptido que es lo suficientemente pequeño como para no limitar la penetración tisular del polipéptido mimético PD-1 de alta

30 afinidad a un nivel inaceptable (que dependería del contexto del procedimiento particular y/o resultado deseado). Por lo tanto, en algunos casos, el segundo polipéptido (es decir, el polipéptido al que se fusiona un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión) es de 200 aminoácidos o menos (por ejemplo, 190 aminoácidos o menos, 180 aminoácidos o menos, 170 aminoácidos o menos, 160 aminoácidos o menos, 150 aminoácidos o menos, 140 aminoácidos o menos, 130 aminoácidos o menos, 120 aminoácidos o menos, 110 aminoácidos o menos, 100

35 aminoácidos o menos, 90 aminoácidos o menos, 80 aminoácidos o menos, 70 aminoácidos o menos, 60 aminoácidos o menos, 50 aminoácidos o menos, 40 aminoácidos o menos, o 30 aminoácidos o menos). En algunos casos, la proteína de fusión tiene un peso molecular promedio de 200 kD o menos, 150 kD o menos, 100 kD o menos, 90 kD o menos, 80 kD o menos, 70 kD o menos, 60 kD o menos, 50 kD o menos, 40 kD o menos, o 30 kD o menos.

45 En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina humana) (por ejemplo, una secuencia Fc de anticuerpos, un dominio CH3 y similares). En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que es sustancialmente similar a un Fc, *por ejemplo*, que proporciona dominios de multimerización de mayor tamaño, y/o unión adicional o interacción con moléculas de Ig. Estas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, la multimerización y mostrar

50 una vida media aumentada *in vivo*. Las proteínas de fusión que tienen estructuras multiméricas unidas por disulfuro también pueden ser más eficientes en la unión y neutralización de otras moléculas que un polipéptido mimético PD-1 monomérico de alta afinidad.

Cuando se fusiona con un polipéptido heterólogo, la porción correspondiente al polipéptido mimético PD-1 de alta

55 afinidad puede denominarse como la "porción de polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad". Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad (por ejemplo, la porción de polipéptido miméticos PD-1 de alta afinidad) pueden tener 70 aminoácidos o más de longitud (por ejemplo, 75 aminoácidos o más, 80 aminoácidos o más, 85 aminoácidos o más, 90 aminoácidos o más, 95 aminoácidos o más, 100 aminoácidos o más, 105 aminoácidos o más, 110 aminoácidos o más, 115 aminoácidos o más, 120 aminoácidos o más, 125 aminoácidos o más, o 130 aminoácidos o

60 más), hasta la longitud total de la porción de la proteína natural que es N-terminal al dominio transmembrana (p. ej.,

165-170 aminoácidos para la proteína PD-1 humana), y puede además fusionarse con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, una inmunoglobulina Fc. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad (por ejemplo, la porción de polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) tiene una longitud en un intervalo de 70 aminoácidos a 170 aminoácidos (por ejemplo, de 70 aminoácidos a 166 aminoácidos), de 75 aminoácidos a 170 aminoácidos, de 80 aminoácidos a 170 aminoácidos, etc.).

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se fusiona o se une de otro modo a una secuencia de inmunoglobulina para formar una proteína quimérica. La secuencia de inmunoglobulina puede ser un dominio o dominios constantes de inmunoglobulina. La fracción de inmunoglobulina en tales quimeras puede obtenerse de cualquier especie, generalmente humana, e incluye los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM. La fracción de inmunoglobulina puede comprender uno o más dominios, *por ejemplo*, CH1, CH2, CH3, etc.

Las quimeras construidas a partir de una secuencia unida a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina apropiada son conocidas en la materia. En tales fusiones, el polipéptido quimérico codificado puede retener al menos dominios funcionalmente activos bisagra, CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se hacen al extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; los sitios particulares son bien conocidos y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad: quimeras de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad: quimeras de inmunoglobulina se ensamblan como monómeros, o hetero u homo multímeros, y en algunos casos como dímeros o tetrámeros.

Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina, se puede incluir una cadena ligera de inmunoglobulina, asociada covalentemente a un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad: polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina, o directamente fusionado al polipéptido. Se puede usar una construcción de cadena simple para proporcionar regiones constantes de cadena pesada y ligera.

En otras construcciones de proteínas de fusión, el segundo polipéptido es una secuencia marcadora, como un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Conforme descrito en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 821-824, 1989, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica útil para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe. Wilson y col., Cell 37: 767, 1984. La adición de fracciones de péptidos para facilitar el manejo de polipéptidos son técnicas familiares y rutinarias en la materia.

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es multivalente (por ejemplo, tetravalente).

Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetrámero, etc. Por ejemplo, uno o más dominios de unión a PD-L1 (y/o PD-L2) pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente, por ejemplo, como una proteína de fusión; disulfuro unido; a través de la unión de biotina a avidina, estreptavidina, etc. Dichos polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad monoméricos o multiméricos son útiles como agentes simples para estimular una respuesta inmune (por ejemplo, para estimular una respuesta inmune general y/o para estimular una respuesta dirigida a una célula que expresa PD-L1, por ejemplo, una célula cancerosa); o en combinación con otros agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede tener un compañero de fusión donde el compañero de fusión proporciona un dominio de multimerización (es decir, un dominio que facilita la multimerización, por ejemplo, un dominio que facilita la dimerización). Por ejemplo, un compañero de fusión puede ser cualquier dominio de interacción proteína-proteína conveniente (por ejemplo, un motivo de cremallera de leucina, un polipéptido synzip (un par de polipéptidos), un dominio CH 3 y similares).

Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad de la presente descripción pueden modificarse, por ejemplo, unirse a una amplia variedad de otros oligopéptidos o proteínas para una variedad de propósitos. Por ejemplo, modificado postraduccionalmente, por ejemplo por prenilación, acetilación, amidación, carboxilación, glicosilación, PEGilación (unión covalente de cadenas de polímeros de polietilenglicol (PEG)), etc. Dichas modificaciones también pueden incluir modificaciones de la glucosilación, *por ejemplo*, las realizadas modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo

el polipéptido a enzimas que afectan la glucosilación, tales como las enzimas de glucosilación o desglucosilación de mamíferos. En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión tiene uno o más residuos de aminoácidos fosforilados, *por ejemplo*, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

- 5 En algunas otras realizaciones, los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad de la descripción incluyen reactivos modificados adicionalmente para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Por ejemplo, variantes de la presente descripción incluyen además análogos que contienen residuos distintos de L-aminoácidos que se producen naturalmente, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no se producen naturalmente. Los D-aminoácidos pueden ser sustituidos por algunos o todos los residuos de aminoácidos.

- Además de su uso como tratamiento para diversos trastornos y enfermedades, los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad son útiles, por ejemplo, como adyuvante para aumentar la función inmune (por ejemplo, cuando se combina con un agente de unión específico, por ejemplo, un anticuerpo, en algunos casos a un anticuerpo específico de células tumorales como se define en esta invención) (por ejemplo, estimulando o reduciendo la inhibición de varias células inmunes, tales como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, granulocitos, células presentadoras de antígeno, células T y similares).

- Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad también son útiles como agentes de formación de imágenes, por ejemplo, cuando se conjugan con una etiqueta detectable, que puede usarse para diversos fines, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, en algunos casos, un procedimiento en cuestión es un procedimiento de diagnóstico o pronóstico de cáncer en un individuo (por ejemplo, un cáncer en el que la presencia, nivel, y/o ubicación de PD-L1 detectable puede ser diagnóstico y/o pronóstico).

- 25 En algunas realizaciones de la descripción, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad está acoplado o conjugado a una o más fracciones para imágenes, es decir, una etiqueta detectable. Como se usa en esta invención, "fracción citotóxica" se refiere a una fracción que inhibe el crecimiento celular o promueve la muerte celular cuando se aproxima a o es absorbida por la célula. Fracciones citotóxicas adecuadas a este respecto incluyen isótopos radiactivos (radionúclidos), agentes quimiotóxicos tales como inductores de diferenciación y fármacos quimiotóxicos pequeños, proteínas de toxina y derivados de los mismos.

- Tal como se utiliza en esta invención, "fracción para imágenes", o etiqueta detectable, se refiere a una fracción que puede utilizarse para aumentar el contraste entre un tumor y el tejido sano circundante en una técnica de visualización, por ejemplo, radiografía, tomografía por emisión de positrones (TEP), imágenes por resonancia magnética (IRM), inspección visual directa o indirecta. Por lo tanto, las fracciones para imágenes adecuadas incluyen fracciones para radiografías, por ejemplo, metales pesados y fracciones emisoras de radiación, fracciones emisoras de positrones, fracciones de contraste de resonancia magnética y fracciones ópticamente visibles (por ejemplo, colorantes fluorescentes o de espectro visible, partículas visibles, etc. Un experto en la materia apreciará que existe cierta superposición entre lo que es una fracción terapéutica y lo que es una fracción para imágenes.

- 40 En general, los agentes terapéuticos o de imagen pueden conjugarse con una fracción de polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad mediante cualquier técnica adecuada, con la consideración apropiada de la necesidad de estabilidad farmacocinética y una toxicidad global reducida para el paciente. Una reacción directa entre un agente y PD-L1 es posible cuando cada uno posee un grupo funcional capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, como un grupo amino o sulfhidrilo, puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (p. ej., un haluro). Alternativamente, se puede usar un grupo enlazador químico adecuado. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para evitar interferencias con las capacidades de unión.

- 50 Será evidente para los expertos en la materia que una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), puede emplearse como un grupo enlazador. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos de carbohidratos oxidados. Existen numerosos antecedentes que describen dicha metodología. Alternativamente, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se une a la fracción citotóxica o para imágenes mediante el uso de un par de unión no covalente, tal como estreptavidina/biotina, o avidina/biotina. En estas realizaciones, un miembro del par está acoplado covalentemente a un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad y el otro miembro del par de unión está acoplado covalentemente a la fracción citotóxica o para imágenes. Puede ser conveniente acoplar más de una fracción citotóxica y/o para imágenes. Al realizar una derivación múltiple del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad, se pueden implementar simultáneamente varias estrategias, se puede hacer que un anticuerpo sea útil como agente de contraste para varias técnicas de visualización, o se puede

etiquetar un anticuerpo terapéutico para seguimiento mediante una técnica de visualización.

Un vehículo puede llevar los agentes en una variedad de vías, incluyendo la unión covalente, tanto directamente o a través de un grupo enlazador, y asociaciones no covalentes. Vehículos de enlace covalente adecuados incluyen
5 proteínas tales como albúminas, péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano, cada uno de los cuales tiene múltiples sitios para la unión de fracciones. Un vehículo también puede llevar un agente por asociaciones no covalentes, tales como enlaces no covalentes o por encapsulación

Vehículos y enlazadores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y
10 compuestos quelantes. Un quelato de radionúclido puede formarse a partir de compuestos quelantes que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como átomos donadores para unir el radionúclido metálico u óxido de metal.

Fracciones radiográficas para usar como fracciones para imágenes en la presente descripción incluyen compuestos y
15 quelatos con átomos relativamente grandes, tales como oro, iridio, tecnecio, bario, talio, yodo y sus isótopos. En algunos casos, se pueden utilizar fracciones para imágenes radiográficas menos tóxicas, tales como yodo o isótopos de yodo, en las composiciones y procedimientos de la descripción. Dichas fracciones pueden conjugarse con el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad a través de un enlazador químico o vehículo de quelación aceptable. Las fracciones emisoras de positrones para uso en la presente descripción incluyen ^{18}F , que puede conjugarse fácilmente
20 mediante una reacción de fluoración con el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad. Ejemplos de emisores de TEP incluyen ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{89}Zr y ^{18}F .

Imágenes de TEP puede incluir el acoplamiento de un emisor de positrones a la proteína. Ejemplos de emisores de TEP incluyen ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{89}Zr y ^{18}F . Estos agentes se pueden acoplar a la proteína usando cualquier procedimiento
25 conveniente, por ejemplo, a través de grupos quelantes, por ejemplo, 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético ácido (DOTA), 1,4,7-Triazaciclononano-1,4,7-triacético ácido (NOTA) y Desferoxamina (DFO). Dichos quelantes se pueden unir covalentemente y de manera específica al sitio a la proteína usando cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, mediante química de maleimida en residuos de cisteína libres, por ejemplo, residuos de cisteína libres diseñados como en cisteínas R87C, N91C, y/o R122C (mutaciones correspondientes a R87C, N91C,
30 y/o R122C en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2).

Fracciones para tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) para uso como fracciones para imágenes en la presente descripción. SPECT es similar a la tomografía por emisión de positrones (TEP) en su uso de material trazador radiactivo y detección de rayos gamma. Sin embargo, a diferencia de la TEP, los trazadores utilizados
35 en SPECT emiten radiación gamma que se mide directamente, mientras que los trazadores TEP emiten positrones que se aniquilan con electrones a unos pocos milímetros de distancia, lo que hace que se emitan dos fotones gamma en direcciones opuestas.

Las fracciones de contraste de resonancia magnética pueden incluir quelatos de cromo (III), manganeso (II), hierro (II),
40 níquel (II), cobre (II), praseodimio (III), neodimio (III), samario (III) e ion iterbio (III). Debido a su momento magnético muy fuerte, los iones gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III) y hierro (III) también se consideran fracciones de contraste.

Fracciones ópticamente visibles para uso como fracciones para imágenes incluyen colorantes fluorescentes, o
45 colorantes de espectro visible, partículas visibles y otras fracciones de etiquetado visibles. Los colorantes fluorescentes como la fluoresceína, la cumarina, la rodamina, el colorante rojo de Texas bodipy y los colorantes de cianina son útiles cuando se puede proporcionar suficiente energía de excitación al sitio para que se inspeccione visualmente. Los procedimientos de visualización endoscópica pueden ser más compatibles con el uso de tales etiquetas. Colorantes aceptables incluyen colores y colorantes alimentarios aprobados por la FDA, que no son tóxicos, aunque se prefieren
50 los colorantes farmacéuticamente aceptables que han sido aprobados para administración interna.

La cantidad efectiva de una composición conjugada para imagen que se administra a un paciente en particular puede depender de una variedad de factores, varios de los cuales serán diferentes de un paciente a otro. Un clínico competente podrá determinar una cantidad efectiva para facilitar la visualización de, por ejemplo, un tumor. La
55 dosificación dependerá del tratamiento del tumor, la vía de administración, la naturaleza de la terapia, la sensibilidad del tumor a la terapia, etc. Utilizando habilidades ordinarias, el clínico competente podrá optimizar la dosificación de una terapia o composición para imágenes particular en el curso de ensayos clínicos de rutina.

Una dosis típica puede ser de 0,001 a 100 miligramos de conjugado por kilogramo de peso corporal del sujeto. Se
60 pueden usar dosis relativamente grandes, en el intervalo de 0,1 a 10 mg por kilogramo de peso corporal del paciente

para imágenes conjugadas con una fracción para imágenes relativamente no tóxica. La cantidad utilizada dependerá de la sensibilidad del procedimiento de imagen y de la toxicidad relativa de la fracción para imágenes.

5 Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad de la presente descripción se pueden producir por cualquier medio adecuado conocido o descubierto posteriormente en el campo, por ejemplo, producido a partir de células eucariotas o procariontas, sintetizado *in vitro*, etc. Cuando la proteína es producida por células procariontas, puede procesarse adicionalmente mediante despliegue, *por ejemplo*, desnaturalización por calor, reducción de DTT, etc. y puede plegarse nuevamente, usando procedimientos conocidos en la materia.

10 En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye una o más mutaciones correspondientes a R87C, N91C y/o R122C en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 3-25 y 39-46. Como se señaló anteriormente, en algunos casos, el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad incluye una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta de imagen de tomografía por emisión de positrones (TEP)). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye una o más mutaciones correspondientes a R87C, N91C y/o R122C en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2, y también incluye una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta de imagen de tomografía por emisión de positrones (TEP)). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión (por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión que incluye una o más mutaciones correspondientes a R87C, N91C, y/o R122C en relación con el fragmento de proteína PD-1 expuesto en SEQ ID NO: 2) incluye una fracción para imágenes de tomografía por emisión de positrones (TEP) (por ejemplo, emisores TEP como ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr y ¹⁸F), SPECT (p. ej., un emisor de rayos gamma), y/o imágenes de fluorescencia (p. ej., un colorante fluorescente como fluoresceína, cumarina, rodamina, colorante rojo de Texas bodipy, colorantes de cianina y similares).

25 Los polipéptidos pueden prepararse mediante sistemas de traducción sin células, o síntesis sintética *in vitro*, usando procedimientos convencionales como se conoce en la materia. Varios aparatos sintéticos comerciales están disponibles, por ejemplo, sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman, etc. Mediante el uso de sintetizadores, los aminoácidos naturales pueden sustituirse con aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida y similares.

Los polipéptidos también pueden aislarse y purificarse según procedimientos convencionales de síntesis recombinante. Se puede preparar un lisado del huésped de expresión y el lisado se puede purificar usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. En la mayor parte, las composiciones que se usan comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, al menos aproximadamente el 75 % en peso, preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % en peso, o al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el procedimiento de preparación del producto y su purificación. Usualmente, los porcentajes se basarán en la proteína total.

40 Procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Alternativamente, el ARN capaz de codificar los polipéptidos de interés puede sintetizarse químicamente. Un experto en la materia puede utilizar fácilmente tablas de uso de codones y procedimientos sintéticos bien conocidos para proporcionar una secuencia de codificación adecuada para cualquiera de los polipéptidos de la descripción. Los ácidos nucleicos pueden aislarse y obtenerse con una pureza sustancial. Por lo general, los ácidos nucleicos, ya sea como ADN o ARN, se obtendrán sustancialmente libres de otras secuencias de ácido nucleico de origen natural, siendo generalmente al menos aproximadamente 50 %, generalmente al menos aproximadamente 90 % de pureza y son típicamente "recombinantes", por ejemplo, flanqueados por uno o más nucleótidos con los que normalmente no está asociado en un cromosoma natural. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden proporcionarse como una molécula lineal o dentro de una molécula circular, y pueden proporcionarse dentro de moléculas (vectores) que se replican de forma autónoma o dentro de moléculas sin secuencias de replicación. La expresión de los ácidos nucleicos puede regularse por sí misma o por otras secuencias reguladoras conocidas en la materia. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden introducirse en células huésped adecuadas usando una variedad de técnicas disponibles en la materia.

Según la presente descripción, los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticas (formulaciones farmacéuticas) adecuadas para uso terapéutico, por ejemplo, para tratamiento humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen

una o más entidades terapéuticas de la presente descripción o sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente descripción en combinación con otro agente terapéutico, *por ejemplo*, otro agente antitumoral.

5

Las entidades terapéuticas de la presente descripción a menudo se administran como composiciones farmacéuticas (formulaciones farmacéuticas) que comprenden un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos, que se definen como vehículos que se utilizan comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de manera de no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros vehículos o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, excipientes y similares.

15

En algunas otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Sepharose™ funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (como gotas de aceite o liposomas).

20

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es multiespecífico (por ejemplo, biespecífico). Los términos "multiespecífico" o "biespecífico" se usan comúnmente en la materia para referirse a anticuerpos que reconocen dos o más antígenos diferentes en virtud de poseer al menos una región (por ejemplo, derivada de una región variable de un primer anticuerpo) que es específica para un primer antígeno, y al menos una segunda región (por ejemplo, derivada de una región variable de un segundo anticuerpo) que es específica para un segundo antígeno (estos anticuerpos también se conocen como anticuerpos bifuncionales o anticuerpos multifuncionales). Un anticuerpo biespecífico se une específicamente a dos antígenos diana y, por lo tanto, es un tipo de anticuerpo multiespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser producidos por procedimientos de ADN recombinante o incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos producidos químicamente por cualquier procedimiento conveniente. Los anticuerpos biespecíficos incluyen todos los anticuerpos o conjugados de anticuerpos, o formas poliméricas de anticuerpos que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos que se han reducido y reformado para retener sus características bivalentes y anticuerpos que se han acoplado químicamente para que puedan tener varios sitios de reconocimiento de antígeno para cada antígeno.

25

30

35

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es multiespecífico (por ejemplo, biespecífico). Por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede ser multiespecífico (p. ej., biespecífico) de modo que una primera región del polipéptido corresponda a una secuencia de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión (que se une específicamente a PD-L1), y una segunda región (el compañero de fusión) (por ejemplo, una secuencia derivada de anticuerpo, por ejemplo, una región de unión de un anticuerpo que comprende esas CDR del anticuerpo; un polipéptido de unión específico; una porción de unión de un ligando; una porción de unión de un receptor, etc.) que se une específicamente a otra diana (p. ej., antígeno, un receptor, un ligando, etc.). Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se fusiona con un segundo polipéptido (un compañero de fusión) que se une específicamente a una secuencia diana distinta de PD-L1. En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se fusiona con un segundo polipéptido (un compañero de fusión) que se une específicamente a una diana distinta de PD-L1 (por lo tanto, dicho polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multimérico puede ser biespecífico y, por lo tanto, uniría 2 dianas/fracciones diferentes).

40

45

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multimérico altera la señalización como resultado de la unión del compañero de fusión a su diana. Por ejemplo, en algunos casos, el compañero de fusión incluye, como compañero de fusión, un ligando o una región de unión de un ligando (por ejemplo, una citocina, una citocina atenuada, etc.) y el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multimérico altera la señalización cuando el ligando se une a su diana (p. ej., un receptor). Del mismo modo, en algunos casos, el compañero de fusión incluye, como compañero de fusión, un receptor o una región de unión de un receptor, y el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multimérico altera la señalización cuando el receptor se une a su diana (por ejemplo, un ligando).

50

55

Los ejemplos de compañeros de fusión adecuados incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de unión de anticuerpos contra marcadores de células cancerosas tales como CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), EGFR, HER2, CD117, C-Met, PTHR2,

60

HAVCR2 (TIM3), etc. Ejemplos de anticuerpos con CDR que proporcionan una unión específica a un marcador de células cancerosas incluyen, pero no se limitan a: CETUXIMAB (se une a EGFR), PANITUMUMAB (se une a EGFR), RITUXIMAB (se une a CD20), TRASTUZUMAB (se une a HER2), PERTUZUMAB (se une a HER2), ALEMTUZUMAB (se une a CD52), BRENTUXIMAB (se une a CD30) y similares.

5

Ejemplos de compañeros de fusión adecuados incluyen una citocina; una citocina atenuada; un agonista de 41 BB; agonista de CD40; un inhibidor de BTLA y/o CD160; y un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico, y se fusiona a uno o más compañeros de fusión seleccionados de entre: una citocina; una citocina atenuada; un agonista de 41BB; agonista de CD40; un inhibidor de BTLA y/o CD160; y un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1. Por ejemplo, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico puede fusionarse con un compañero de fusión que es una citocina modificada que tiene una afinidad disminuida (reducida en relación con una citocina natural correspondiente) por su ligando/receptor. Dicha citocina modificada se denomina en esta invención 'citocina atenuada'. Un ejemplo de una citocina atenuada (un ejemplo de un posible compañero de fusión) es una proteína IL-2 que tiene mutaciones que disminuyen la afinidad por dos de las subunidades del receptor de IL-2 (por ejemplo, F42A para disminuir la unión a CD25 y D20T para disminuir la unión a CD122) (p. ej., ver SEQ ID NO: 39).

En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico y tiene un compañero de fusión que es un agonista de 41BB (p. ej., 41BBL, p. ej., ver SEQ ID NO: 40). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico y tiene un compañero de fusión que es un agonista de CD40 (p. ej., CD40L, p. ej., ver SEQ ID NO: 41). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico y tiene un compañero de fusión que es un inhibidor de BTLA y/o CD160 (p. ej., ver SEQ ID NO: 42). En algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad multiespecífico y tiene un compañero de fusión que es un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1 (p. ej., ver SEQ ID NO: 43).

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión y un compañero de fusión están separados por un enlazador (por ejemplo, un polipéptido enlazador). Un polipéptido enlazador puede tener cualquiera de una variedad de secuencias de aminoácidos. Las proteínas que pueden unirse mediante un polipéptido enlazador puede ser de naturaleza flexible (por ejemplo, un polipéptido enlazador flexible), aunque no se excluyen otros enlaces químicos. Los enlazadores adecuados incluyen polipéptidos de entre aproximadamente 6 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, o entre aproximadamente 6 aminoácidos y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Estos enlazadores pueden producirse usando oligonucleótidos sintéticos que codifican enlazadores para acoplar las proteínas. Se pueden usar enlazadores peptídicos con cierto grado de flexibilidad. Los péptidos de unión pueden tener prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos, teniendo en cuenta que, en algunos casos, los enlazadores tendrán una secuencia que da como resultado un péptido generalmente flexible. El uso de aminoácidos pequeños, como la glicina y la alanina, son útiles para crear un péptido flexible. La creación de tales secuencias es rutinaria para los expertos en la materia. Una variedad de diferentes enlazadores están disponibles comercialmente y se consideran adecuados para su uso.

40

Los ejemplos de polipéptidos enlazadores incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, GSGGS_n (SEQ ID NO: 47), GGS_n (SEQ ID NO: 48), y GGGS_n (SEQ ID NO: 49), donde n es un número entero de al menos un (por ejemplo, donde n es un número entero de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina. Enlazadores ejemplares pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, GGSG (SEQ ID NO: 50), GGS_n (SEQ ID NO: 51), GSGSG (SEQ ID NO: 52), GSGGG (SEQ ID NO: 53), GGGSG (SEQ ID NO: 54), GSSSG (SEQ ID NO: 55), y similares. El experto en la materia reconocerá que el diseño de un péptido conjugado con cualquier elemento descrito anteriormente puede incluir enlazadores que sean total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador pueda incluir un enlazador flexible, así como una o más porciones que confieran una estructura menos flexible.

50

Ácidos nucleicos. La descripción también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad.

55

Para la producción recombinante del polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad, el ácido nucleico que codifica el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se puede insertar en un vector replicable para una mayor clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales. Muchos vectores se encuentran disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes: una

60

secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

Un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión de esta descripción puede producirse de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo u homólogo, que puede incluir una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro, una secuencia de región constante de inmunoglobulina, y similares. Preferentemente, la secuencia señal heteróloga seleccionada es una reconocida y procesada (por ejemplo, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente se asocia antes del aislamiento. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o el entorno en el que se puede encontrar en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales.

Los ejemplos de células huésped adecuadas para clonar o expresar ácidos nucleicos en cuestión incluyen, pero no se limitan necesariamente a, células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR(CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1.982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad y cultivadas en medios de nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes que codifican las secuencias deseadas.

Introducción de ácidos nucleicos. En algunos casos, como el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se administra a un individuo proporcionando el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN, por ejemplo, un ARNm; o un ADN, por ejemplo, un vector de expresión recombinante, un ADN lineal, un ADN circular, un plásmido, un vector viral, etc.) que codifica el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad. Esta descripción proporciona tales procedimientos y también los ácidos nucleicos para tales procedimientos.

Por ejemplo, un ARNm que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad puede introducirse en una célula, y la célula puede a continuación secretar la proteína traducida. Como otro ejemplo, un ADN (p. ej., un vector de expresión recombinante, un ADN lineal, un ADN circular, un plásmido, un vector viral, etc.) que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad puede introducirse en una célula y la célula puede a continuación producir y secretar la proteína codificada. Por lo tanto, en algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal (p. ej., aguas arriba de y en marco con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) . Como reconocería fácilmente un experto en la materia, una secuencia de señal a la que se hace referencia aquí es una secuencia de aminoácidos en o cerca del extremo amino de una proteína naciente que puede ser reconocida por la partícula de reconocimiento de señal de una célula eucariota, dando como resultado el transporte de la proteína hacia la vía secretora de la célula, facilitando así la secreción de una proteína desde la célula (por ejemplo, la secuencia señal puede escindir de la proteína). Se puede usar cualquier secuencia señal conveniente.

En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se introduce en una célula (por ejemplo, in vivo, ex vivo, in vitro) y la célula puede a continuación producir y secretar la proteína codificada. En algunos casos, la célula está in vitro. En algunos casos, la célula está ex vivo. En algunos casos, la célula está in vivo. Por ejemplo, en algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se introduce en una célula que está in vivo (por ejemplo, en algunos casos, se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en una célula in vivo administrando el ácido nucleico a un individuo). En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión se introduce en una célula (por ejemplo, ex vivo, in vitro) y la célula se introduce a continuación en un individuo. En algunos casos,

la célula es autóloga del individuo (por ejemplo, la célula se aisló del individuo o es la progenie de una célula que se aisló del individuo).

En algunos casos (p. ej., en cualquiera de los escenarios anteriores, p. ej., in vitro, ex vivo, in vivo), la célula en la que se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es una célula inmune (por ejemplo, un leucocito, una célula T, una célula T CD8, una célula T CD4, una célula T de memoria/efectora, una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC), una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, una célula NK y similares). En algunos casos (p. ej., en cualquiera de los escenarios anteriores, p. ej., in vitro, ex vivo, in vivo), la célula en la que se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad es una célula madre (p. ej., una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre multipotente, una célula madre restringida de tejido, etc.). En algunos casos (p. ej., en cualquiera de los escenarios anteriores, p. ej., in vitro, ex vivo, in vivo), la célula en la que se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es una célula inmune (por ejemplo, un leucocito, una célula T, una célula T CD8, una célula T CD4, una célula T de memoria/efectora, una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC), una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, una célula NK y similares) o una célula madre (por ejemplo, una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre multipotente, una célula madre con restricción de tejido, etc.).

En algunos casos (p. ej., en cualquiera de los escenarios anteriores, p. ej., in vitro, ex vivo, in vivo), la célula en la que se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión es una célula T con un receptor de células T (TCR) diseñado (dicha célula también se denomina en esta invención una "célula T TCR diseñada"). Como se usa en esta invención, el término "célula T TCR diseñada" se refiere a cualquier célula T que tenga un receptor de células T que sea heterólogo a la célula T. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a (i) una célula T que incluye un receptor de antígeno quimérico (CAR) (dicha célula también se denomina en esta invención una "célula CAR-T" o una "célula CAR-T diseñada"); y (ii) una célula T que incluye un TCR heterólogo que se une a un antígeno tal como un antígeno de cáncer, por ejemplo, MART1, NY-ESO-1, p53 y similares (por ejemplo, dicha célula puede incluir un ácido nucleico que codifica los polipéptidos TcR-alfa y TcR-beta de un TCR heterólogo, tal como un TCR que se une a un antígeno tal como un antígeno de cáncer, por ejemplo, MART1, NY-ESO-1, p53 y similares).

En algunos casos, una célula T diseñada TCR adecuada puede tener un TCR diseñado (por ejemplo, un TCR heterólogo que se une a un antígeno, un CAR, etc.) que se une a un marcador de cáncer (por ejemplo, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), EGFR, HER2, CD117, C-Met, PTHR2, y/o HAVCR2 (TIM3)). En algunos casos, una célula T diseñada TCR adecuada puede tener un TCR diseñado (por ejemplo, un TCR heterólogo que se une a un antígeno, un CAR, etc.) que se une a un antígeno diana seleccionado de PD-L1 (por ejemplo, un CAR derivado de un anticuerpo anti-PD-L1) y PD-1 (por ejemplo, un CAR derivado de un anticuerpo anti-PD-1). En algunos casos, una célula T diseñada TCR adecuada puede tener un TCR diseñado (por ejemplo, un TCR heterólogo que se une a un antígeno, un CAR, etc.) que se une a PD-L1 (por ejemplo, un CAR derivado de un anticuerpo anti-PD-L1). En algunos casos, una célula T diseñada TCR adecuada puede tener un TCR diseñado (por ejemplo, un TCR heterólogo que se une a un antígeno, un CAR, etc.) que se une a PD-1 (por ejemplo, un CAR derivado de un anticuerpo anti-PD-1). En algunos casos, una célula T diseñada TCR adecuada puede tener un TCR diseñado (por ejemplo, un TCR heterólogo que se une a un antígeno, un CAR, etc.) que se une a CD19 (por ejemplo, el CAR 1D3).

En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión también incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de células T (TCR). En algunos de estos casos, el ácido nucleico incluye secuencias de nucleótidos que codifican tanto un polipéptido alfa TCR como un polipéptido beta TCR del TCR. En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión también incluye una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos TcR-alfa y TcR-beta de un TCR heterólogo (como un TCR que se une a un antígeno como un antígeno de cáncer, por ejemplo, MART1, NY-ESO-1, p53 y similares) y/o codifica un CAR (por ejemplo, un CAR de primera generación, un CAR de segunda generación, un CAR de tercera generación y similares). Los diversos componentes, incluida la secuencia que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión, así como las secuencias que codifican los polipéptidos TcR-alfa y TcR-beta de un TCR heterólogo y la secuencia que codifica un CAR son modulares. Por lo tanto, las diversas secuencias pueden estar operativamente unidas al mismo o diferentes promotores. Aquellos componentes que están operativamente unidos a un mismo promotor pueden estar separados por secuencias que permiten que las proteínas eventualmente existan como polipéptidos separados (por ejemplo, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), secuencias de péptidos 2A, etc.). Los ejemplos de varias disposiciones posibles incluyen, entre otros, los representados en las **Figs. 20A-20E** y **Figs. 21A-21D**. Por lo tanto, los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluyen, pero no se limitan a, los representados en las **Figs. 20A-20E** y **Figs. 21A-21D**.

Un "vector" o "vector de expresión" es un replicón, como un plásmido, fago, virus o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ADN, es decir, un "inserto", para lograr la replicación del segmento unido en una célula.

- 5 Un "casete de expresión" comprende una secuencia de codificación de ADN unida operativamente a un promotor. "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.
- 10 Los términos "vector de expresión recombinante", "construcción de ADN" o "vector de expresión" y términos similares de la técnica se usan indistintamente en esta invención para referirse a una molécula de ADN que comprende un vector y al menos un inserto. Se pueden generar vectores de expresión recombinantes con el fin de expresar y/o propagar el(los) inserto(s), o para la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. El(los) inserto(s) (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión)
- 15 puede o no estar operativamente unido a una secuencia promotora y puede o no estar operativamente unido a secuencias reguladoras de ADN. Por lo tanto, en algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión está operativamente unida a un promotor (por ejemplo, uno que es operable en un tipo celular deseado, por ejemplo, una célula eucariota, una célula de mamífero, una célula de primate, una célula humana, una célula inmune, un leucocito, una célula T, una célula T CD8, una célula T CD4, una
- 20 célula T de memoria/efectora, una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC), una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, una célula NK, una célula madre, una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre multipotente, una célula madre con restricción de tejido, etc.).

- Un promotor puede ser un promotor constitutivamente activo (es decir, un promotor que está constitutivamente en estado activo/"ON"), puede ser un promotor inducible (es decir, un promotor cuyo estado, activo/"ON" o inactivo/"OFF", es controlado por un estímulo externo, por ejemplo, la presencia de una temperatura, compuesto o proteína particular), puede ser un promotor espacialmente restringido (es decir, elemento de control transcripcional, potenciador, etc.) (por ejemplo, promotor específico de tejido, promotor específico del tipo celular, etc.), y puede ser un promotor temporalmente restringido (es decir, el promotor está en el estado "ON" u "OFF" durante etapas específicas del
- 30 desarrollo embrionario o durante etapas específicas de un procedimiento biológico, por ejemplo, ciclo del folículo piloso en ratones).

- Los promotores adecuados pueden derivarse de virus y, por lo tanto, pueden denominarse promotores virales, o pueden derivarse de cualquier organismo, incluidos organismos procariontes o eucariotas. Se pueden usar promotores
- 35 adecuados para conducir la expresión por cualquier polimerasa ARN (por ejemplo, pol I, pol II, pol III). Los promotores ejemplares incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano SV40, el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus del tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) como la región promotora temprana inmediata del CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor nuclear pequeño U6 humano (U6) (Miyagishi y col., Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)), un promotor U6 mejorado (por ejemplo, Xia y col., Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)), un promotor H1 humano (H1), y similares.
- 40

- Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, promotor de polimerasa ARN T7, promotor de polimerasa ARN T3, promotor regulado por isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), promotor inducido por lactosa,
- 45 promotor de choque térmico, promotor regulado por tetraciclina, promotor regulado por esteroides, promotor regulado por metal, promotor regulado por receptor de estrógeno, etc. Por lo tanto, los promotores inducibles pueden regularse mediante moléculas que incluyen, pero no se limitan a, doxiciclina; polimerasa ARN, por ejemplo, polimerasa ARN T7; un receptor de estrógeno; una fusión de receptor de estrógeno; etc.

- 50 En algunas realizaciones, el promotor es un promotor espacialmente restringido (es decir, un promotor específico del tipo celular, un promotor específico de tejido, etc.) de modo que, en un organismo multicelular, el promotor está activo (es decir, "ON") en un subconjunto de células específicas. Los promotores restringidos espacialmente también pueden denominarse potenciadores, elementos de control transcripcional, secuencias de control, etc. Se puede utilizar cualquier promotor convenientemente restringido espacialmente y la elección del promotor adecuado (por ejemplo, un
- 55 promotor específico del cerebro, un promotor que acciona la expresión en un subconjunto de neuronas, un promotor que acciona la expresión en la línea germinal, un promotor que acciona la expresión en los pulmones, un promotor que acciona la expresión en los músculos, un promotor que acciona la expresión en las células de los islotes del páncreas, etc.) dependerá del organismo. Por ejemplo, se conocen varios promotores restringidos espacialmente para plantas, moscas, gusanos, mamíferos, ratones, etc. Por lo tanto, se puede usar un promotor restringido espacialmente
- 60 para regular la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido modificador dirigido al sitio en cuestión en

una amplia variedad de diferentes tipos de tejidos y tipos celulares, dependiendo del organismo. Algunos promotores restringidos espacialmente también están restringidos temporalmente, de modo que el promotor está en el estado "ON" u "OFF" durante etapas específicas del desarrollo embrionario o durante etapas específicas de un procedimiento biológico (por ejemplo, ciclo del folículo piloso en ratones).

5

Para fines ilustrativos, los ejemplos de promotores restringidos espacialmente incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de neuronas, promotores específicos de adipocitos, promotores específicos de cardiomiocitos, promotores específicos de músculo liso, promotores específicos de fotorreceptores, etc. Los promotores incluyen, pero no se limitan a, un promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (ver, por ejemplo, EMBL HSENO2, X51956); un promotor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC); un promotor de neurofilamentos (ver, por ejemplo, GenBank HUMNFL, L04147); un promotor de sinapsina (ver, por ejemplo, GenBank HUMSYNIB, M55301); un promotor thy-1 (ver, por ejemplo, Chen y col. (1987) *Cell* 51:7-19; y Llewellyn, y col. (2010) *Nat. Med.* 16(10):1161-1166); un promotor del receptor de serotonina (ver, por ejemplo, GenBank S62283); un promotor de tirosina hidroxilasa (TH) (ver, por ejemplo, Oh y col. (2009) *Gene Ther* 16:437; Sasaoka y col. (1992) *Mol. Brain Res.* 16:274; Boundy y col. (1998) *J. Neurosci.* 18:9989; y Kaneda y col. (1991) *Neuron* 6:583-594); un promotor de GnRH (ver, p.ej., Radovick y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 88:3402-3406); un promotor de L7 (ver, p.ej., Oberdick y col. (1990) *Science* 248:223-226); un promotor de DNMT (ver, p.ej., Bartge y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85:3648-3652); un promotor de encefalina (ver, p.ej., Comb y col. (1988) *EMBO J.* 17:3793-3805); un promotor de la proteína básica de mielina (MBP); un promotor de la proteína quinasa II-alfa dependiente de Ca²⁺-calmodulina (CamKII α) (ver, por ejemplo, Mayford y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 93:13250; y Casanova y col. (2001) *Genesis* 31:37); un promotor del potenciador del CMV/factor β de crecimiento derivado de plaquetas (ver, p.ej., Liu y col. (2004) *Gene Therapy* 11:52-60); y similares.

Los promotores espacialmente restringidos específicos de adipocitos incluyen, entre otros, el promotor/potenciador del gen aP2, por ejemplo, una región de -5,4 kb a +21 pb de un gen aP2 humano (ver, por ejemplo, Tozzo y col. (1997) *Endocrinol.* 138:1604; Ross y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 87:9590; y Pavjani y col. (2005) *Nat. Med.* 11:797); un promotor del transportador de glucosa-4 (GLUT4) (ver, por ejemplo, Knight y col. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 100:14725); un promotor de translocasa de ácido graso (FAT/CD36) (ver, por ejemplo, Kuriki y col. (2002) *Biol. Pharm. Bull.* 25:1476; y Sato y col. (2002) *J. Biol. Chem* 277:15703); un promotor de esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1) (Tabor y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:20603); un promotor de leptina (ver, por ejemplo, Mason y col. (1998) *Endocrinol.* 139:1013; y Chen y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 262:187); un promotor de adiponectina (ver, por ejemplo, Kita y col. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 331:484; y Chakrabarti (2010) *Endocrinol.* 151:2408); un promotor de adiposina (ver, por ejemplo, Platt y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86:7490); un promotor de resistina (ver, por ejemplo, Seo y col. (2003) *Molec. Endocrinol.* 17:1522); y similares.

35

Los promotores restringidos espacialmente específicos de cardiomiocitos incluyen, pero no se limitan a, secuencias de control derivadas de los siguientes genes: cadena ligera de miosina-2, cadena pesada de α -miosina, AE3, troponina C cardíaca, actina cardíaca y similares. Franz y col. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins y col. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn y col. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek y col. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:1870-1885; Hunter y col. (1993) *Hypertension* 22:608-617; y Sartorelli y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:4047-4051.

Los promotores restringidos espacialmente específicos del músculo liso incluyen, pero no se limitan a, un promotor de SM22 α (ver, por ejemplo, Akyurek y col. (2000) *Mol. Med.* 6:983; y Patente de EE. UU. N° 7.169.874); un promotor de esmotelina (ver, por ejemplo, WO 2001/018048); un promotor de actina del músculo liso α ; y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que una región de 0,4 kb del promotor de SM22 α , dentro del cual se encuentran dos elementos CArG, median la expresión específica de la célula del músculo liso vascular (ver, por ejemplo, Kim, y col. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 2266-2278; Li, y col., (1996) *J. Cell Biol.* 132, 849-859; y Moessler, y col. (1996) *Development* 122, 2415-2425).

50

Los promotores restringidos espacialmente específicos de fotorreceptores incluyen, pero no se limitan a, un promotor de rodopsina; un promotor de rodopsina quinasa (Young y col. (2003) *Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:4076); un promotor del gen beta fosfodiesterasa (Nicoud y col. (2007) *J. Gene Med.* 9:1015); un promotor del gen de la retinitis pigmentosa (Nicoud y col. (2007) *supra*); un potenciador del gen de la proteína de unión al interfotorreceptor retinoide (IRBP) (Nicoud y col. (2007) *supra*); un promotor del gen IRBP (Yokoyama y col. (1992) *Exp Eye Res.* 55:225); y similares.

55

Los términos "secuencias reguladoras de ADN", "elementos de control" y "elementos reguladores", usados indistintamente en esta invención, se refieren a secuencias de control transcripcionales y traducionales, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, señales de degradación de proteínas y similares, que proporcionan y/o regulan la transcripción de una secuencia no codificante (p. ej., ARN dirigido al ADN) o una

60

secuencia codificante (p. ej., polipéptido modificador dirigido al sitio, o polipéptido Cas9/Csn1) y/o regulan la traducción de un polipéptido codificado.

Vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores virales (por ejemplo, vectores virales basados en virus vaccinia; poliovirus; adenovirus (ver, por ejemplo, Li y col., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2543 2549, 1994; Borrás y col., *Gene Ther* 6: 515 524, 1999; Li y Davidson, *PNAS* 92: 7700 7704, 1995; Sakamoto y col., *H Gene Ther* 5: 1088 1097, 1999; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655); virus adenoasociado (ver, por ejemplo, Ali y col., *Hum Gene Ther* 9: 81 86, 1998, Flannery y col., *PNAS* 94: 6916 6921, 1997; Bennett y col., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2857 2863, 1997; Jomary y col., *Gene Ther* 4: 683 690, 1997, Rolling y col., *Hum Gene Ther* 10: 641 648, 1999; Ali y col., *Hum Mol Genet* 5: 591 594, 1996; Srivastava en WO 93/09239, Samulski y col., *J. Vir.* (1989) 63: 3822-3828; Mendelson y col., *Vírol.* (1988) 166:154-165; y Flotte y col., *PNAS* (1993) 90:10613-10617); SV40; virus del herpes simple; virus de inmunodeficiencia humana (ver, por ejemplo, Miyoshi y col., *PNAS* 94:10319 23, 1997; Takahashi y col., *J Vírol* 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 materia, 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 (Farmacia). 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. (ver, por ejemplo, Bitter y col. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

También se proporcionan en esta descripción células que incluyen un ácido nucleico (por ejemplo, como se describe anteriormente) que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión. Dicha célula puede ser una célula de cualquier organismo (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula arqueana, una célula de un organismo eucariota unicelular, una célula de planta, una célula de alga, una célula fúngica (por ejemplo, una célula de levadura), una célula animal, una célula de un animal invertebrado (p. ej., mosca de la fruta, cnidario, equinodermo, nematodo, etc.), una célula de un animal vertebrado (p. ej., pez, anfibio, reptil, ave, mamífero), una célula de un mamífero, una célula de un roedor, una célula de un ser humano, etc.).

Procedimientos de uso

Se describen procedimientos para tratar, reducir y/o impedir el cáncer; tratar, reducir y/o impedir la infección (p. ej., infección crónica); y/o para tratar, reducir y/o impedir una enfermedad o trastorno inmunológico (p. ej., una enfermedad inflamatoria, una afección asociada con la inmunosupresión, etc.) (p. ej., esclerosis múltiple, artritis y similares). Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede usarse como un estimulante inmune (por ejemplo, usado para inmunopotenciación).

En algunos casos, los procedimientos en cuestión reducen el número de células cancerosas en un individuo. En algunos casos, los procedimientos en cuestión resultan en una reducción del tamaño del tumor. En algunos casos, los procedimientos en cuestión reducen la unión de PD-1 en una primera célula con PD-L1 en una segunda célula.

En algunos casos, un procedimiento en cuestión es un procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico para un individuo (p. ej., diagnóstico y/o pronóstico del cáncer en un individuo). Por ejemplo, los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad son útiles como agentes de imagen, por ejemplo, cuando se conjugan con una etiqueta detectable como una etiqueta TEP y/o etiqueta fluorescente (por ejemplo, como se describe en otra parte de esta descripción), que se puede usar para diversos fines, como reactivos para diagnóstico/pronóstico. Por ejemplo, en algunos casos, un procedimiento en cuestión es un procedimiento de diagnóstico o pronóstico de cáncer en un individuo (por ejemplo, un cáncer en el que la presencia, nivel, y/o ubicación de PD-L1 detectable puede ser diagnóstico y/o pronóstico).

La inhibición de la señalización celular mediada por PD-1 por agentes terapéuticos (p. ej., un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión) puede activar las células inmunes (p. ej., células T, células B, células NK, etc.) y, por lo tanto, mejorar las funciones de las células inmunes, como inhibir el crecimiento de células cancerosas y/o infección viral, y restablecer la vigilancia inmune y la función de memoria inmune para tratar enfermedades humanas. Ejemplos

de síntomas, dolencias y/o enfermedades que pueden tratarse con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluyen, pero no se limitan a, cáncer (cualquier forma de cáncer, que incluye, pero no se limita a: carcinomas, tumores de tejidos blandos, sarcomas, teratomas, melanomas, leucemias, linfomas, cánceres cerebrales, tumores sólidos, mesotelioma (MSTO), etc.); infección (por ejemplo, infección crónica); y/o una enfermedad o trastorno inmunológico (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria) (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis y similares). Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede usarse como un estimulante inmune (por ejemplo, usado para inmunopotenciación). Cualquier enfermedad, trastorno o dolencia que implique inmunosupresión (por ejemplo, causada por una señal inmunosupresora inducida por la señalización PD-1, PD-L1 o PD-L2) puede tratarse usando un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión.

10

Cualquier cáncer es un cáncer adecuado para ser tratado por los procedimientos y composiciones en cuestión. En algunos casos, las células cancerosas del cáncer expresan PD-L1 (es decir, son positivas para la expresión de PD-L1). En algunos casos, las células cancerosas del cáncer no expresan PD-L1, sin embargo, estos cánceres todavía se pueden tratar con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad (p. ej., debido a la inmunopotenciación por el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad).

15

Como se usa en esta invención, "cáncer" incluye cualquier forma de cáncer, incluidos, entre otros, cánceres de tumor sólido (por ejemplo, pulmón, próstata, mama, vejiga, colon, ovario, páncreas, riñón, hígado, glioblastoma, meduloblastoma, leiomioma, sarcomas de células escamosas de la cabeza y del cuello, melanomas, neuroendocrinos; etc.) y cánceres líquidos (p. ej., cánceres hematológicos); carcinomas tumores de tejidos blandos; sarcomas; teratomas; melanomas; leucemias; linfomas y cánceres cerebrales, que incluyen enfermedad residual mínima, y que incluyen tumores tanto primarios como metastásicos. Cualquier cáncer es un cáncer adecuado para ser tratado por los procedimientos y composiciones en cuestión. En algunos casos, las células cancerosas expresan PD-L1. En algunos casos, las células cancerosas no expresan PD-L1 (por ejemplo, en tales casos, las células del sistema inmune del individuo que se está tratando expresan PD-L1).

20

Los carcinomas son tumores malignos que se originan en los tejidos epiteliales. Las células epiteliales cubren la superficie externa del cuerpo, recubren las cavidades internas y forman el revestimiento de los tejidos glandulares. Los ejemplos de carcinomas incluyen, entre otros: adenocarcinoma (cáncer que comienza en las células glandulares (secretoras)), por ejemplo, los cánceres de mama, páncreas, pulmón, próstata y colon pueden ser adenocarcinomas; carcinoma adrenocortical; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células renales; carcinoma de ovario; carcinoma in situ; carcinoma ductal; carcinoma de mama; carcinoma de células basales; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células de transición; carcinoma de colon; carcinoma nasofaríngeo; carcinoma de células renales quístico multilocular; carcinoma de células de avena; carcinoma de pulmón de células grandes; carcinoma de pulmón de células pequeñas; carcinoma de pulmón de células no pequeñas; y similares. Los carcinomas se pueden encontrar en próstata, páncreas, colon, cerebro (generalmente como metástasis secundarias), pulmón, mama, piel, etc.

30

35

Los tumores de tejidos blandos son un grupo muy diverso de tumores raros que se derivan del tejido conectivo. Los ejemplos de tumores de tejidos blandos incluyen, entre otros: sarcoma alveolar de partes blandas; histiocitoma fibroso angiomatoide; fibroma condromioma; condrosarcoma esquelético; condrosarcoma mixoide extraesquelético; sarcoma de células claras; tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor del estroma endometrial; sarcoma de Ewing; fibromatosis (desmoide); fibrosarcoma infantil; tumor del estroma gastrointestinal; tumor óseo de células gigantes; tumor de células gigantes tenosinoviales; tumor miofibroblástico inflamatorio; leiomioma uterino; leiomioma; lipoblastoma; lipoma típico; lipoma de células fusiformes o pleomorfo; lipoma atípico; lipoma condroide; liposarcoma bien diferenciado; liposarcoma mixoide/de células redondas; liposarcoma pleomórfico; histiocitoma fibroso maligno mixoide; histiocitoma fibroso maligno de alto grado; mixofibrosarcoma; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos; mesotelioma; neuroblastoma; osteocondroma; osteosarcoma; tumor neuroectodérmico primitivo; rhabdomyosarcoma alveolar; rhabdomyosarcoma embrionario; schwannoma benigno o maligno; sarcoma sinovial; Tumor de Evan; fascitis nodular; fibromatosis de tipo desmoide; tumor fibroso solitario; dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP); angiosarcoma; hemangioendotelioma epitelioide; tumor de células gigantes tenosinoviales (TGCT); sinovitis villonodular pigmentada (PVNS); displasia fibrosa; mixofibrosarcoma; fibrosarcoma; sarcoma sinovial; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos; neurofibroma; y adenoma pleomórfico de tejidos blandos; y neoplasias derivadas de fibroblastos, miofibroblastos, histiocitos, células vasculares/células endoteliales y células de la vaina nerviosa.

40

45

50

55

Un sarcoma es un tipo raro de cáncer que surge en las células de origen mesenquimatoso, por ejemplo, en los huesos o en los tejidos blandos del cuerpo, incluidos los cartílagos, las grasas, los músculos, los vasos sanguíneos, los tejidos fibrosos u otros tejidos conectivos o de soporte. Los diferentes tipos de sarcoma se basan en el lugar donde se forma el cáncer. Por ejemplo, el osteosarcoma se forma en los huesos, el liposarcoma en las grasas y el rhabdomyosarcoma en los músculos. Los ejemplos de sarcomas incluyen, entre otros: tumor de Askin; sarcoma botrioides; condrosarcoma;

60

sarcoma de Ewing; hemangioendotelioma maligno; schwannoma maligno; osteosarcoma; y sarcomas de tejidos blandos (p. ej., sarcoma alveolar de partes blandas; angiosarcoma; cistosarcoma filodes; dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP); tumor desmoide; tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; sarcoma epiteliode; condrosarcoma extraesquelético; osteosarcoma extraesquelético; fibrosarcoma; tumor estromal gastrointestinal (GIST); hemangiopericitoma; hemangiosarcoma (más comúnmente conocido como "angiosarcoma"); sarcoma de Kaposi; leiomiosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; tumor maligno de la vaina de nervios periféricos (MPNST); neurofibrosarcoma; sarcoma sinovial; sarcoma pleomórfico indiferenciado, y similares).

Un teratoma es un tipo de tumor de células germinales que puede contener varios tipos diferentes de tejido (por ejemplo, puede incluir tejidos derivados de cualquiera y/o las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo), que incluyen, por ejemplo, cabello, músculos y huesos. Los teratomas se producen con mayor frecuencia en los ovarios en las mujeres, los testículos en los hombres y el coxis en los niños.

El melanoma es una forma de cáncer que comienza en los melanocitos (células que producen el pigmento melanina). Puede comenzar en un lunar (melanoma de la piel), pero también puede comenzar en otros tejidos pigmentados, como los ojos o los intestinos.

Las leucemias son cánceres que comienzan en el tejido formador de sangre, como la médula ósea, y hacen que se produzca un gran número de células sanguíneas anormales que ingresan al torrente sanguíneo. Por ejemplo, las leucemias pueden originarse en células derivadas de la médula ósea que normalmente maduran en el torrente sanguíneo. Las leucemias reciben su nombre por la rapidez con que se desarrolla y progresa la enfermedad (p. ej., aguda versus crónica) y por el tipo de glóbulos blancos afectados (p. ej., mieloides versus linfoides). Las leucemias mieloides también se denominan leucemias mielógenas o mieloblásticas. Las leucemias linfoides también se llaman leucemia linfoblástica o linfocítica. Las células de leucemia linfóide pueden acumularse en los ganglios linfáticos, que pueden inflamarse. Ejemplos de leucemias incluyen, sin limitación: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

Los linfomas son cánceres que comienzan en las células del sistema inmune. Por ejemplo, los linfomas pueden originarse en células derivadas de la médula ósea que normalmente maduran en el sistema linfático. Hay dos categorías básicas de linfomas. Un tipo es el linfoma de Hodgkin (LH), que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula llamada célula de Reed-Sternberg. Actualmente hay 6 tipos reconocidos de LH. Los ejemplos de linfomas de Hodgkin incluyen: esclerosis nodular, linfoma de Hodgkin clásico (LHC), LHC de celularidad mixta, LHC de agotamiento de linfocitos, LHC rico en linfocitos y LH predominante de linfocitos nodulares.

La otra categoría de linfoma es el linfoma no Hodgkin (LNH), que incluye un grupo grande y diverso de cánceres de células del sistema inmune. Los linfomas no Hodgkin se pueden dividir en cánceres que tienen un curso indolente (crecimiento lento) y aquellos que tienen un curso agresivo (crecimiento rápido). Actualmente hay 61 tipos reconocidos de LNH. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin incluyen, pero no se limitan a: Linfomas relacionados con el SIDA, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angioinmunoblástico, linfoma de células NK blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma tipo Burkitt (linfoma de células pequeñas no escindidas), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células T cutáneas, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma folicular, linfomas hepatoesplénicos de células T gamma-delta, leucemias de células T; linfoma linfoblástico; linfoma de células del manto; linfoma de zona marginal; linfoma de células T nasales; linfoma pediátrico; linfomas de células T periféricas, linfoma primario del sistema nervioso central; linfomas transformados; linfomas de células T relacionados con el tratamiento y macroglobulinemia de Waldenstrom.

Los cánceres cerebrales incluyen cualquier cáncer de los tejidos del cerebro. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, entre otros: gliomas (p. ej., glioblastomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y similares), meningiomas, adenomas pituitarios, schwannomas vestibulares, tumores neuroectodérmicos primitivos (meduloblastomas), etc.

Como se usa en esta invención, el término "infección" se refiere a cualquier estado en al menos una célula de un organismo (es decir, un sujeto) que está infectado por un agente infeccioso (por ejemplo, un sujeto tiene una infección por patógeno intracelular, por ejemplo, una infección crónica por patógeno intracelular). Como se usa en esta invención, el término "agente infeccioso" se refiere a una entidad biológica extraña (es decir, un patógeno) que induce PD-L (PD-L1 y/o PD-L2) (p. ej., aumento de la expresión de PD-L) en al menos una célula del organismo infectado. Por ejemplo, los agentes infecciosos incluyen, entre otros, bacterias, virus, protozoos y hongos. Los patógenos intracelulares son de particular interés. Las enfermedades infecciosas son trastornos causados por agentes infecciosos. Algunos agentes infecciosos no causan síntomas o enfermedades reconocibles en ciertas afecciones, pero tienen el potencial de causar síntomas o enfermedades en condiciones cambiantes. Los procedimientos en cuestión pueden usarse en el

tratamiento de infecciones por patógenos crónicos, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, infecciones virales, por ejemplo, retrovirus, lentivirus, virus de hepadna, virus del herpes, virus de la viruela, virus del papiloma humano, etc.; infecciones bacterianas intracelulares, por ejemplo, *Mycobacterium*, *Chlamydomphila*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Legionella*, *Francisella*, *Listeria*, *Coxiella*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Yersinia sp.*, *Helicobacter pylori*, etc.; y protozoarios

5 patógenos intracelulares, por ejemplo, *Plasmodium sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Giardia sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Leishmania sp.*, etc.

Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar con un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión incluyen, pero no se limitan a: VIH, Influenza, Herpes, *Giardia*, *Malaria*, *Leishmania*, la infección patógena por el virus

10 Hepatitis (A, B, & C), virus del herpes (p. ej., VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, echovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral, infección patógena por la bacteria clamidia, bacterias rickettsiales, *micobacteria*, *estafilococos*, *estreptococos*, *neumonococos*,

15 *meningococos* y *conococos*, *klebsiella*, *proteus*, *serratia*, *pseudomonas*, *E. coli*, *legionella*, difteria, *salmonella*, *bacilos*, cólera, tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirosis, y bacteria de la enfermedad de Lyme, infección patógena por los hongos *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizophus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* y *Histoplasma capsulatum*, e infección patógena por los parásitos *Entamoeba*

20 *histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleriafowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi*, y/o *Nippostrongylus brasiliensis*.

En algunas realizaciones, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede bloquear las señales

25 inhibitoras inducidas por PD-L (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2), y por lo tanto permiten la activación de una célula inmune. Por lo tanto, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede facilitar y/o estimular la producción de citocina y/o quimiocina por las células inmunes, particularmente las células inmunes que expresan PD-1 en la superficie celular. Por ejemplo, la presencia de un complejo inmune (es decir, un complejo antígeno-anticuerpo) que interactúa con una célula inmune activa la célula inmune e induce la producción de citocinas por la célula inmune,

30 pero esta activación (estimulación) puede ser inhibida por PD-L en la superficie de una segunda célula. Un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede usarse para alterar la inmunorrespuesta de una célula inmune y, por lo tanto, puede ser útil para tratar o impedir una enfermedad o trastorno inmunológico (por ejemplo, un trastorno asociado con inmunosupresión). En otras palabras, un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión puede usarse para inmunopotenciación (estimulación del sistema inmune) como un agente que simula el sistema inmune.

35 Los procedimientos anteriores incluyen administrar a un individuo que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva o una dosis efectiva de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión, incluidas, entre otras, combinaciones de un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad con un fármaco (por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, un anticuerpo específico para tumores, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco para tratar

40 infecciones, un inmunoestimulante, es decir, un inmunopotenciador, un agente que simula el sistema inmune, etc.).

Las dosis efectivas de las composiciones para el tratamiento del cáncer varían dependiendo de muchos factores diferentes, como los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico en cuestión, si el sujeto es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente

45 es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosis de tratamiento pueden ajustarse para optimizar la seguridad y la eficacia.

La dosis terapéutica puede variar de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del

50 peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez por mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente descripción generalmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica

55 midiendo los niveles sanguíneos de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, las entidades terapéuticas de la presente descripción pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían según la vida media del polipéptido en el paciente.

60 En aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco

frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, la patente puede administrarse en un régimen profiláctico.

Los procedimientos de la presente descripción incluyen tratar, reducir o impedir cualquiera de las afecciones, dolencias y/o enfermedades discutidas anteriormente (p. ej., crecimiento tumoral, metástasis tumoral o invasión tumoral de cánceres, incluidos linfomas, leucemias, carcinomas, melanomas, glioblastomas, sarcomas, mielomas, etc.). Para aplicaciones profilácticas, composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otra manera en riesgo de, enfermedad en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos, cognitivo y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión pueden usarse *in vitro* y *in vivo* para monitorear el curso de la terapia de la enfermedad, por ejemplo, midiendo el aumento o la disminución en el número de células que expresan PD-L (PD-L1 y/o PD-L2), particularmente células infectadas crónicamente y/o células cancerosas que expresan PD-L1, se puede determinar si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar la enfermedad es efectivo. Para tales fines, los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad pueden etiquetarse de forma detectable.

Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión pueden usarse *in vitro* en ensayos de unión en los que pueden utilizarse en fase líquida o unirse a un vehículo en fase sólida. Además, los polipéptidos en estos inmunoensayos pueden etiquetarse de manera detectable de varias maneras. Ejemplos de tipos de ensayos que pueden utilizar polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad son la citometría de flujo, por ejemplo, FACS, MACS, histoquímica, inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto; y similares. La detección de PD-L utilizando un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se puede realizar con ensayos que se ejecutan en los modos directo, inverso o simultáneo, incluidos los ensayos histoquímicos en muestras fisiológicas.

Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar la presencia de PD-L (PD-L1 y/o PD-L2) que expresan células. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la descripción. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para unir proteínas, o podrán determinarlos, utilizando experimentación de rutina.

Hay muchas etiquetas y procedimientos de etiquetado diferentes conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se pueden usar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, nanopartículas, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la materia conocerán otras etiquetas adecuadas para unión a los polipéptidos de la descripción, o podrán determinarlos, utilizando experimentación de rutina. Además, la unión de estas etiquetas a los polipéptidos de la descripción se puede hacer usando técnicas estándar comunes a los expertos en la materia.

PD-L puede ser detectado por polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión cuando está presente en fluidos y tejidos biológicos. Se puede usar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de PD-L. Una muestra puede ser un líquido como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y similares, o un sólido o semisólido como tejidos, heces, biopsia y similares, o, alternativamente, un tejido sólido como aquellos comúnmente utilizados en el diagnóstico histológico.

Otra técnica de etiquetado que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar los polipéptidos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos se pueden detectar a continuación específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos como la biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

Los conjugados para imágenes de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad se pueden administrar al sujeto en una serie de más de una administración. Las composiciones conjugadas para imágenes pueden administrarse en un momento apropiado antes de la técnica de visualización. Por ejemplo, la administración dentro de una hora antes de la inspección visual directa puede ser apropiada, o la administración dentro de las doce horas antes de una exploración TEP o IRM puede ser apropiada. Sin embargo, se debe tener cuidado de no dejar pasar demasiado tiempo entre la

administración y la visualización, ya que el compuesto para imágenes puede eliminarse del sistema del paciente.

Las composiciones para el tratamiento (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, infección crónica, inmunosupresión, inflamación, etc.) pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, intratumoral, oral, subcutánea, 5 intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, medios intranasales o intramusculares. Una ruta típica de administración es intravenosa o intratumoral, aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas.

Las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. 10 La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se discutió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta descripción pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas 15 pueden ser estériles y/o sustancialmente isotónicas y/o en cumplimiento absoluto con todas las leyes sobre prácticas de buena fabricación (GPM) de la Administración de Alimentos y Fármacos de EE. UU.

La toxicidad de los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad descritos en esta invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, 20 determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para uso en humanos. La dosificación de las proteínas descritas en esta invención se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La 25 dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente.

También se describen kits que comprenden las composiciones (*p.ej.*, polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad y 30 formulaciones de los mismos) de la descripción y las instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, un anticuerpo antitumoral y un fármaco contra la infección, por ejemplo, un fármaco antiviral, *etc.* Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

35 CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

Proteína PD-1 humana natural

(también conocida como PDCD1, CD279, PD1, SLEB2, hPD-1, hPD-I y hSLE1)
40 (negrita: dominio transmembrana, aminoácidos 168-191; subrayado: aminoácidos 26-147)

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE
SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL
CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGVVGGLLGSLVLLV
WVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTE
YATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
(SEQ ID NO: 1)

Fragmento de polipéptido PD-1 humano natural (R87, N91 y R122 están subrayados)

45 (ejemplo de un polipéptido mimético PD-1 en cuestión; un "polipéptido mimético PD-1 de fragmento natural")

DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRS
QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 2)

HAC-I PD-1 (Consenso de alta afinidad con isoleucina en la posición 41)

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV~~I~~WHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRRNDSTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 3)

5 HAC-V PD-1 (Consenso de alta afinidad con valina en la posición 41)

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV~~V~~WHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRRNDSTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 4)

10 G2 4-1 (Generación 2, clon 4-1)

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV~~V~~WHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGPDARFRVTQLPNGRDFHLSVVRARRRNDSTYVCGAISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 5)

G2 4-2

15 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFH~~I~~WHRESPSGQDTLAAFPEDRSQ
PGQDARFRVTQLPNGRDFHLSVVRARRRNDSTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 6)

G2 4-3

20 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFH~~V~~IWHLESPSGQDTLAAFPEDRSQ
PGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRRNDSTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 7)

G2 4-5

25 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV~~V~~WHRESPSSQDTLAAFPEDRS
QPGPDARFRVTQLPNGRDFQLSVVRARRRNDSTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 8)

G2 4-12

30 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV~~V~~WHYESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHLSVVRARRRNDSTYVCGIISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 9)

G1 4-12

30 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESF~~H~~LNWYR~~Q~~SPD~~C~~K~~V~~F~~K~~LAAFPEDRS
~~I~~PN~~P~~DCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRRNDSTY~~C~~GAI~~T~~IS~~P~~G~~P~~QIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 10)

G1 4-2

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHLWFRQSPLGQLFKLAAFPEDRSIP
RQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRARRNDSGTYVCGAISYSPEIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 11)

G1 4-5

5

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHLWFRQSPNGQVRKLAAFPEDRS
EPIPDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRARRNDSGTYVCGAISYAAIVQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 12)

G1 4-1

10

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFRLWHRESPGYETDILASFPEDRS
IPLPDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRARRNDSGTYVCGAIAFHPVIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 13)

G1 4-4

15

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFRLWHRESPNNHAYILALFPEDRS
PFPDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRARRNDSGTYICGAITFDPRIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 14)

G1 4-10

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHLWHRLSPVYQTVLLAAFPEDRSP
PVQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRARRNDSGTYLCGAISYDPTIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 15)

20

G2 4-10

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVWHYDSPSGQTDILAAFPEDRS
QPGPDCRFRITQLPNGRDFHESVRARRNDSGTYICGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 16)

G2 4-14

25

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVWHYESPSGQTDILAAFPEDRS
QPGPDCRFRVTQLPNGRDFHESVRARRNDSGTYICGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 17)

G2 4-4

30

DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFHIWHRESPSCQTDILAAFPEDRSQ
PGQDCRFRITQLPNGRDFHESVRARRNDSGTEVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTER
(SEQ ID NO: 18)

G2 4-22

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHIIWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRSQ
 PGQDCRFR^ITQLPNGRDFH^ESVVRARRNDSGT^FVCGV^ISLAPK^IQIKESLRAELRVTER
 (SEQ ID NO: 19)

G2 4-6

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFRLVWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRS
 QPGQDCRFR^ITQLPNGRDFH^ESVVRARRNDSGT^FVCGAIS^FAPK^IQIKESLRAELRVTER
 (SEQ ID NO: 20)

5

G2 4-7

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRS
 QPGQDCRFR^ITQLPNGRDFH^LSVVRARRNDSGT^FVCGV^ISLAPK^IQIKESLRAELRVTER
 (SEQ ID NO: 21)

10

G2 4-18

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVIWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRS
 QPGPDCRFR^ITQLPNGRDFHMSVVRARR^KNDSGT^YVCG^IISLAPK^IQIKESLRAELRVTER
 (SEQ ID NO: 22)

15

G2 4-23

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHIIWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRSQ
 PGPDCRFR^VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT^YVCGV^ISLAPK^IQIKESLRAELRVTER
 (SEQ ID NO: 23)

20

Polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad multimerizados (p. ej., para una farmacocinética mejorada) (es decir, fusión a un dominio de multimerización)
 HAC-V 'microcuerpo'
 (HAC-V PD-1 fusionado al dominio IgG1 CH3 humano, incluida la región bisagra)

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRS
 QPGQDARFR^VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT^YVCGV^ISLAPK^IQIKESLRAELRVTEREPK
 SCDKTH^TCP^PCGGGSSGGGSGGQPREPQVY^TLPPSREEMTKN^QVSL^TCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHY^TQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO: 24)

25

HAC-V Fc fusión
 (HAC-V PD-1 fusionada con IgG humana Fc; aquí IgG4 humana para funciones efectoras reducidas (en comparación con otras regiones Fc) y mutación S228P para impedir el intercambio de brazos Fab; enlazador AAA entre la variante PD-1 y Fc está incluido)

30

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRES^UPSG^UQTD^ILAAFPEDRS
 QPGQDARFR^VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT^YVCGV^ISLAPK^IQIKESLRAELRVTERAAA

PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

Fusiones a citocinas "atenuadas"
Ejemplo: HAC-IL2 (F42A/D20T)

5 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERGG
GGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLTLMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHL
QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI
TFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 39)

Fusiones a agonistas de 41BB
Ejemplo: HAC-41BBL

10 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERGG
GGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL
VVAKAGVYVFFQME LR RVVAGEGSGSVSLALHLMPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA
FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA (SEQ ID NO: 40)

Fusiones a agonistas de CD40
Ejemplo: HAC-CD40L

15 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERGG
GGSGGGGSGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY
YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
GASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 41)

Fusiones a inhibidores de BTLA y/o CD160
Ejemplo: señuelo HAC-BTLA:

20 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESPSGQDTLAAFPEDRS
QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERGG
GGSGGGGGSWNIHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTC
VKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLVYTDVK (SEQ ID
NO: 42)

Fusiones a inhibidores de TIM3 y/o CEACAM1
Ejemplo: Señuelo HAC-TIM3:

25

DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESQGTDTLAAFPEDRS
 QPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVCVVISLAPKIQIKESLRAELRVTERGG
GGSGGGGSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVLRTERD
 VNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLK (SEQ ID NO: 43)

Mutantes de cisteína (p. ej., para etiquetado TEP)
 HAC-VN91C

5 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESQGTDTLAAFPE
 DRSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRCDSGTVCVVISLAPKIQIKESLRAELR
 VTER (SEQ ID NO: 44)

HAC-VR87C

10 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESQGTDTLAAFPE
 DRSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVCARRNDSGTVCVVISLAPKIQIKESLRAELR
 VTER (SEQ ID NO: 45)

HAC-VR122C

15 DSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESQGTDTLAAFPE
 DRSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVCVVISLAPKIQIKESLRAELR
 VTEC (SEQ ID NO: 46)

La invención se describe ahora con más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

EXPERIMENTACIÓN

20 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos expertos habituales en la materia una descripción y
 revelación 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 en relación con los números
 usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones
 25 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 centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Además, debido a la redundancia de codones, se pueden hacer cambios en la secuencia de ADN subyacente sin
 afectar la secuencia de la proteína. Además, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, se pueden
 30 hacer cambios en la estructura de la proteína sin afectar la acción biológica en especie o cantidad.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo demuestra la creación de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad que antagonizan
 35 efectivamente la interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad pueden
 usarse como agentes terapéuticos para las mismas indicaciones que los anticuerpos PD-1 y PD-L1 (por ejemplo, los
 que están actualmente en ensayos clínicos).

La Fig. 1A representa un esquema que ilustra PD-L1 en la superficie de una célula tumoral que se une específicamente
 40 a PD-1 en la superficie de una célula T para inhibir la activación de la célula T, permitiendo así que la célula tumoral
 evada la destrucción por el sistema inmune. La Fig. 1B representa un esquema que ilustra un polipéptido mimético
 PD-1 de alta afinidad en cuestión que se une específicamente a PD-L1 en la superficie de una célula cancerosa,
 reduciendo así la capacidad de la célula cancerosa para inhibir la activación de las células T, lo que, a su vez, reduce
 la capacidad de la célula cancerosa para evadir la respuesta inmune.

45 La Fig. 2A describe una representación estructural de la interacción de PD-1 (arriba a la derecha) con PD-L1 (abajo

a la izquierda). Los residuos de PD-1 ubicados en el sitio de contacto con PD-L1 se representan como esferas. Se mutagenizó un polipéptido mimético PD-1 (que comprende residuos de aminoácidos naturales) en los residuos que contactan a PD-L1 para generar una biblioteca de primera generación (Generación 1) de polipéptidos mutados, que se exhibieron en la superficie de células de levadura. Selecciones basadas en la unión se realizaron a continuación
 5 usando 100 nM de PD-L1 humana biotinilada. Para detectar polipéptidos miméticos PD-1 que tienen una afinidad aún mayor por PD-L1, se generó una biblioteca de segunda generación (Generación 2) de polipéptidos mutados, enfocando la mutagénesis en posiciones convergentes. Se usó 1 nM de PD-L1 humana biotinilada para detectar la biblioteca de la Generación 2. Ver la **Fig. 2B** para los resultados de las detecciones.

- 10 La tabla de la **Fig. 3** refleja las secuencias de las variantes modificadas (polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad en cuestión) que se produjeron. Las variantes "G1" son de la biblioteca de la Generación 1, mientras que las variantes "G2" son de la biblioteca de la Generación 2 (ver Fig. 2A-2B). Cada columna numerada representa la posición de aminoácidos para cada residuo mostrado en relación con el polipéptido mimético PD-1 nativo establecido como SEQ ID NO: 2 (El polipéptido de SEQ ID NO: 2 es un polipéptido mimético PD-1 que incluye una secuencia PD-1 natural,
 15 pero carece de un dominio transmembrana y carece de los primeros 25 aminoácidos del PD-1 natural). Para cada polipéptido mimético PD-1 recuperado, la divergencia del residuo de aminoácido natural se indica con el código de una letra para la mutación resultante para cada variante. La afinidad de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) medida para PD-L1 se indica (cuando se mide) a la derecha. En base a las secuencias recuperadas, se generaron polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad que contienen mutaciones de aminoácidos de consenso, y se denominan
 20 "HAC" (High Affinity Consensus - Consenso de Alta Afinidad).

La **Fig. 4** representa dos gráficos representativos de Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) de experimentos de unión (para la unión a PD-L1) que se realizaron. La vida media de disociación para un polipéptido mimético PD-1 nativo (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) fue inferior a un segundo. Por el contrario, la vida media de disociación para una variante de consenso de alta afinidad PD-1 HAC-I (un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad en cuestión) fue de 42,4 minutos, lo que demuestra que el polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad se unió con afinidad mucho mayor a PD-L1 que el polipéptido mimético PD-1 nativo.
 25

A continuación, se realizaron experimentos para probar adicionalmente las características de unión de algunos de los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad producidos en comparación con un polipéptido mimético PD-1 nativo.
 30 Las **Figs. 5A-5C** muestran que los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad producidos se unen potente y específicamente a PD-L1. Visualización con levadura: (**Fig. 5A**) PD-L1 humano, (**Fig. 5B**) PD-L2 humano, o (**Fig. 5C**) PD-L1 de ratón, se tiñeron con tetrámeros de estreptavidina del polipéptido mimético PD-1 nativo marcado (un polipéptido mimético PD-1 de control que tiene secuencias PD-1 humanas naturales y se conjuga con Alexa647). La
 35 unión del polipéptido mimético PD-1 nativo marcado a PD-L1 se compitió con concentraciones variables de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad no marcados (concentraciones indicadas en el eje x).

Un polipéptido mimético PD-1 nativo no etiquetado (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) antagonizó la interacción PD-1/PD-L1. Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad (HAC-V PD-1, G2 4-1 y G2 4-2)
 40 antagonizaron poderosamente la interacción PD-1/PD-L1 a concentraciones mucho más bajas que el polipéptido mimético PD-1 nativo, lo que demuestra que, de hecho, son polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad (**Fig. 1A**). Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad no demostraron antagonismo de la interacción PD-1:PD-L2, mientras que un polipéptido mimético PD-1 nativo antagonizó la interacción PD-1:PD-L2. Por lo tanto, estos polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad particulares tenían una mayor afinidad por PD-L1 en comparación con la afinidad por
 45 PD-L1 del polipéptido mimético PD-1 nativo, pero tenían una afinidad disminuida por PD-L2 en comparación con la afinidad por PD-L2 del polipéptido mimético PD-1 nativo (**Fig. 1B**). Los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad producidos también pudieron competir por la unión al PD-L1 de ratón (**Fig. 5C**).

A continuación, se probó la capacidad de los polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad producidos para antagonizar
 50 PD-L1 en células cancerosas humanas. La **Fig. 6A** demuestra que PD-L1 se expresó en la línea celular del melanoma humano SKMEL28 después de la inducción por estimulación con 2000 U/mL de interferón humano gamma (IFN γ) durante 24 horas (la tinción del PD-L1 se evaluó mediante citometría de flujo en condiciones inducidas (más IFN γ) versus no inducidas (menos IFN γ)). Células SKMEL28 estimuladas con IFN γ se tiñeron con tetrámeros de estreptavidina del polipéptido mimético PD-1 nativo marcado (un polipéptido mimético PD-1 de control que tiene
 55 secuencias PD-1 humanas naturales y conjugado con Alexa647) con concentraciones variables de polipéptidos miméticos PD-1 de alta afinidad sin marcar (concentraciones indicadas en el eje x) (**Fig. 6B**). Un polipéptido mimético PD-1 nativo no etiquetado (que tiene secuencias PD-1 humanas naturales) fue ineficaz para impedir (requería altas concentraciones para impedir) la unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado a las células SKMEL28 (IC₅₀ = 8,2 μ M). Por el contrario, HAC-V (un polipéptido mimético PD-1 de alta afinidad) inhibió de manera potente la unión
 60 del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado (IC₅₀ de 210 pM). HAC-MBH (HAC-V, un polipéptido mimético PD-1

de alta afinidad, fusionado con el dominio CH3 de la IgG1 humana) inhibió la unión del polipéptido mimético PD-1 nativo etiquetado con potencia adicionalmente mejorada (IC50 de 55 pM).

5 **Ejemplo 2: Variantes de PD-1 de alta afinidad diseñadas para inmunoterapia optimizada e imágenes por inmunoTEP. (algunos datos se comparten con el Ejemplo 1)**

La señalización a través del control inmune PD-1 permite la progresión del tumor al amortiguar las respuestas inmunes antitumorales. El bloqueo terapéutico del eje de señalización entre PD-1 y su ligando PD-L1 con anticuerpos monoclonales ha demostrado un éxito clínico notable en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los anticuerpos tienen limitaciones inherentes que pueden reducir su eficacia en este entorno, incluidos la pobre penetración tejido/tumor y funciones Fc-efectoras perjudiciales que agotan las células inmunes. Para determinar si la inmunoterapia dirigida PD-1/PD-L1 podría mejorarse con terapias más pequeñas, sin anticuerpos, aquí se utilizó la evolución dirigida por visualización de superficie con levadura para diseñar el ectodominio PD-1 como un antagonista competitivo de alta afinidad (100 pM) de PD-L1. A diferencia de los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1, PD-1 de alta afinidad demostró una penetración tumoral superior sin inducir el agotamiento de las células T efectoras periféricas. De acuerdo con estas ventajas, en los modelos tumorales CT26 singénicos, PD-1 de alta afinidad fue eficaz en el tratamiento de tumores pequeños (~50 mm³) y grandes (>150 mm³), mientras que la actividad de los anticuerpos anti-PD-L1 fue completamente anulada contra tumores grandes. Además, PD-1 de alta afinidad fue radioetiquetado y aplicado como un trazador de imágenes TEP para distinguir eficientemente entre los tumores PD-L1-positivos y PD-L1-negativos en ratones vivos, proporcionando una alternativa a la biopsia invasiva y al análisis histológico. Estos resultados resaltan la farmacología favorable de terapias pequeñas, sin anticuerpos, para mejorar la inmunoterapia del cáncer y el diagnóstico inmune.

25 **RESULTADOS**

25 **Evolución dirigida de variantes de PD-1 de alta afinidad que antagonizan PD-L1.** Dada su modesta afinidad por PD-L1 (K_D de 8,2 μ M)¹⁸, el ectodominio PD-1 natural es un pobre candidato para antagonizar competitivamente la interacción PD-1:PD-L1 en un contexto terapéutico. Por lo tanto, la afinidad de PD-1 por PD-L1 se mejoró utilizando la evolución dirigida con visualización de superficie con levadura. La estrategia diseñada empleó una estrategia de dos bibliotecas. Se usó una primera biblioteca para identificar "puntos activos" mutacionales que imparten grandes ganancias en afinidad, y una segunda biblioteca sirvió para determinar la combinación óptima de mutaciones beneficiosas derivadas de la primera biblioteca.

35 Para diseñar la biblioteca inicial de "primera generación", se utilizó la estructura cristalina del complejo entre PD-1 murino (mPD-1) y PD-L1 humano (hPD-L1)¹⁹ para identificar 22 residuos correspondientes en PD-1 humano (hPD-1) en la interfaz de contacto con PD-L1 para la aleatorización (Fig. 7A; Fig. 12A-12B). Esta biblioteca se mostró en la superficie de la levadura y se realizaron cuatro rondas de selección usando ectodominio hPD-L1 biotinilado recombinante como reactivo de selección (Fig. 7B, "Generación 1"). La caracterización biofísica de los clones restantes mostró un aumento de 400 a 500 veces en la afinidad por hPD-L1, medido por Resonancia de Plasmones Superficiales (Fig. 7C). Sin embargo, los clones exhibieron un comportamiento bioquímico pobre, con un rendimiento de expresión disminuido y una tendencia a la agregación. La inspección de las secuencias de las variantes (Fig. 7C) mostró un promedio de 16 mutaciones por clon, con varias de las posiciones aleatorias convergiendo en un pequeño conjunto de mutaciones (por ejemplo, V39, N41), mientras que otras posiciones parecían divergir completamente (por ejemplo, S48, D52), o, por el contrario, tener una preferencia estricta por el residuo original natural (por ejemplo, P105, E111).

45 Los resultados sugirieron que las variantes de "primera generación" probablemente contenían una mezcla de mutaciones beneficiosas, mutaciones de pasajeros no funcionales y mutaciones nocivas, como era de esperar dada la gran diversidad teórica de la biblioteca (aproximadamente 10²⁰) que fue muestreada con 10⁸ transformantes de levadura.

50 De este modo, se creó una biblioteca de "segunda generación" para eliminar las sustituciones innecesarias y perjudiciales, al tiempo que se optimizaban simultáneamente las combinaciones de mutaciones que imparten afinidad mejorada (Fig. 13A-13B). La biblioteca se centró en aquellas posiciones que parecían converger lejos del tipo natural y también introdujo variación en las posiciones "centrales" dentro del ectodominio PD-1 (Fig. 7A). A través de 5 rondas de selección, se obtuvieron variantes que se unían fuertemente a PD-L1 (Fig. 7B, "Generación 2"). En comparación con hPD-1 natural, las variantes seleccionadas se unieron a hPD-L1 con una afinidad mejorada 15.000-40.000 veces, y mostraron una fuerte tendencia hacia la convergencia en una secuencia de consenso de 10 sustituciones de aminoácidos que comprenden ocho residuos de contacto y dos residuos centrales (Fig. 7C). Se produjeron dos versiones de este "consenso de alta afinidad" (HAC) PD-1, que diferían solo por una isoleucina o valina en la posición 41 (denominadas HAC-I y HAC-V, respectivamente), y se descubrió que no se podían distinguir por afinidad o

comportamiento bioquímico. Ambas variantes de HAC-PD-1 podían expresarse fácilmente, eran monoméricas y se unían a hPD-L1 con valores de K_D de aproximadamente 100 pM (Fig. 7C). Al igual que con las otras variantes de alta afinidad, este aumento en la afinidad se debió en gran medida a una reducción dramática en la tasa de desactivación, produciendo vidas medias de disociación de aproximadamente 40 minutos, en comparación con menos de un segundo la interacción hPD-1:hPD-L1 natural (Fig. 8A).

Para evaluar la capacidad de las variantes de PD-1 diseñadas para antagonizar PD-L1 en células cancerosas, se realizaron experimentos de unión competitiva en líneas celulares de melanoma humano y murino. En células SK-MEL-28 humanas, HAC-V bloqueó la unión de tetrámeros PD-1 naturales con un IC_{50} de 210 pM, una mejora de 40.000 veces en potencia en comparación con PD-1 natural ($IC_{50} = 8,2 \mu M$) (Fig. 8B). Aunque las selecciones se realizaron utilizando PD-L1 humano, HAC-V también mostró un bloqueo mejorado de PD-L1 en células murinas B16-F10 ($IC_{50} = 69 \text{ nM}$) en comparación con hPD-1 natural ($IC_{50} = 2,6 \mu M$), aunque con una potencia disminuida en relación con su bloqueo en células humanas (Fig. 8B). Para generar una variante HAC-PD-1 que podría antagonizar más eficazmente mPD-L1 para estudios *in vivo*, la secuencia de HAC-V se fusionó con el dominio CH3 dimerico de IgG1 humana para crear un "microcuerpo" HAC (HACmb; Fig. 14). En virtud de la mayor avidéz impartida por su estructura dimerica, HACmb bloqueó potentemente tanto hPD-L1 ($IC_{50} = 55 \text{ pM}$) como mPD-L1 ($IC_{50} = 1,2 \text{ nM}$) en células SKMEL28 y B16-F10, respectivamente (Fig. 8B). También se caracterizó la reactividad cruzada de HAC-PD-1 para el segundo ligando de PD-1, PD-L2. En experimentos de unión competitiva en levaduras que muestran el ectodominio de hPD-L2, HAC-PD-1 no inhibió de manera medible la interacción PD-1:PD-L2, en comparación con PD-1 natural ($IC_{50} = 2,5 \mu M$; Fig. 8B). Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que HAC-PD-1 puede antagonizar de manera potente y específica PD-L1 (y, por lo tanto, también podría servir como un andamio modular para diseños adicionales).

Estudios de penetración tumoral y agotamiento de células T Para evaluar la unión de PD-L1 y la penetración tumoral de HAC-PD-1 *in vivo*, se usaron técnicas de edición del genoma para generar sublíneas de la línea CT26 de cáncer de colon de ratón que fueron definitivamente negativas para la expresión de mPD-L1, o negativas para mPD-L1 pero constitutivamente positivas para la expresión de hPD-L1. Estas líneas celulares positivas y negativas de PD-L1 podrían distinguirse fácilmente mediante tinción *in vitro* con anticuerpo anti-hPD-L1 etiquetado fluorescentemente o con proteína HAC-PD-1 etiquetada fluorescentemente (Fig. 15A). Usando estas líneas de diseño, los ratones se injertaron bilateralmente con tumores PD-L1 negativos y hPD-L1 positivos. Una vez que los tumores habían crecido hasta aproximadamente 1 cm de diámetro, se administró sistémicamente una inyección intraperitoneal de una mezcla de anticuerpo anti-hPD-L1 etiquetado con fluoróforo y HAC-PD-1 etiquetado con fluoróforo. Después de 4 horas, se diseccionaron los tumores emparejados y se evaluó el grado de unión de cada agente utilizando microscopía de fluorescencia y análisis FACS.

En todos los tumores negativos para PD-L1, el análisis histológico no reveló unión detectable por el anticuerpo anti-PD-L1 o HAC-PD-1, confirmando la especificidad de ambos agentes (Fig. 9A). En contraste, se observó claramente la unión tanto del anticuerpo como de HAC-PD-1 en tumores positivos para hPD-L1, pero con distribuciones sorprendentemente diferentes. Mientras que la señal de fluorescencia asociada con el anticuerpo se limitaba a las regiones periféricas del tumor y las células inmediatamente adyacentes a los vasos, la tinción con HAC-PD-1 se extendió, extendiéndose a regiones profundas dentro del tumor (Fig. 9A y Fig. 15B). Estas observaciones cualitativas fueron respaldadas por el análisis FACS de tumores PD-L1 positivos y negativos emparejados después de la disociación no enzimática. Ni el anticuerpo ni el HAC PD-1 interactuaron apreciablemente con las células de los tumores negativos para PD-L1 (Fig. 9B). Sin embargo, en los tumores que expresan hPD-L1, muchas células fueron positivas para la tinción de HAC-PD-1, y una población sustancial fue positiva tanto para el anticuerpo anti-PD-L1 como para la unión de HAC-PD-1 (Fig. 9B). En contraste, pocas células, si alguna, fueron positivas solo para la tinción de anticuerpos anti-PD-L1 (Fig. 9B). La cuantificación de esta señal sobre múltiples experimentos reveló una ventaja significativa para la unión de HAC-PD-1 ($p < 1 \times 10^{-4}$), con más del doble de células unidas en promedio por HAC-PD-1 que por el anticuerpo anti-PD-L1 (Fig. 9C). Tomados en conjunto, estos datos ilustran que HAC-PD-1 pudo unirse a PD-L1 en células tumorales que de otro modo serían inaccesibles para la unión de anticuerpos.

Además de su tamaño más pequeño, HAC-PD-1 carece de un dominio Fc y, por lo tanto, se razonó que, en contraste con los anticuerpos, no contribuiría a un agotamiento inmunomediado del número de células T circulantes. Para probar esta hipótesis, ratones Balb/c naturales fueron injertados con tumores derivados de la línea CT26 de cáncer de colon singénico, y comenzando 14 días después del injerto, se les administraron tratamientos diarios de PBS, anticuerpo anti-PD-L1 o HACmb (utilizado en este caso por su unión mejorada a mPD-L1). 72 horas después del inicio del tratamiento, los ratones inyectados con anticuerpo anti-PD-L1 mostraron una disminución del 15 % ($p = 0,011$) de células T CD8+ en sangre circulante periférica (Fig. 9D). Aunque la expresión de PD-L1 fue detectable en la gran mayoría de las células CD4+ y CD8+ (Fig. 16), el efecto depletivo fue específico para las células T CD8+, moderando el compartimento CD4+ (Fig. 9D). A diferencia del anticuerpo, el tratamiento diario con la proteína HACmb no tuvo un efecto detectable en los niveles de células T circulantes (Fig. 9D), aunque sus efectos en las células T de los ganglios

linfáticos fueron ligeramente más complejos. Al igual que en la sangre, el tratamiento con el anticuerpo anti-PD-L1 condujo a un agotamiento significativo de las células T CD8+ (Fig. 9E, ~20 %, $p < 1 \times 10^{-4}$). Sin embargo, a diferencia de la sangre, donde no tuvo efecto, el tratamiento con HACmb condujo a una ligera disminución en los niveles de células T CD8+ en los ganglios linfáticos, aunque en un grado significativamente menor que el anticuerpo anti-PD-L1 (Fig. 9E, ~10 %, $p = 0,022$). Esta observación sugiere que agentes dirigidos por PD-1/PD-L1 pueden tener efectos pleiotrópicos sobre la dinámica de las células T que incluyen el agotamiento mediado por Fc, así como la simulación del tráfico de células T hacia los tumores.

Eficacia terapéutica de HAC-PD-1 en modelos de tumores singénicos. Dado que los agentes HAC PD-1 antagonizaron eficazmente tanto la PD-L1 humana como la del ratón, se probó si este bloqueo podía, por extensión, reproducir los efectos antitumorales de los anticuerpos anti-PD-L1. Como prueba inicial de la eficacia *in vivo* de HAC-PD-1, ratones Balb/c inmunocompetentes fueron injertados con tumores singénicos CT26, que previamente habían demostrado ser sensibles a los anticuerpos anti-PD-L1. El día 7 después del injerto, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 50 mm³ en promedio, los ratones fueron asignados al azar a cohortes de tratamiento y comenzaron inyecciones diarias con PBS, anticuerpo anti-PD-L1 o HACmb (Fig. 10A). Como se esperaba, los tumores de ratones tratados con PBS crecieron rápidamente (Fig. 10B). Sin embargo, para el día 14, el tratamiento con anti-PD-L1 o HACmb ralentizó significativamente el crecimiento tumoral en relación con los controles (Fig. 10B, $p = 2 \times 10^{-4}$ y $p < 1 \times 10^{-4}$, respectivamente). Estos dos agentes mostraron una eficacia casi idéntica en este estudio de tumor pequeño, sin diferencia estadística en el crecimiento tumoral entre los dos brazos de tratamiento (Fig. 10B, $p = 0,99$). A partir de estos resultados terapéuticos *in vivo* se concluye que, en el contexto de tumores relativamente pequeños, HACmb es indistintamente eficaz para el tratamiento de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 bien validados.

Muchos informes de modelos de cáncer de ratón dependen del tratamiento muy temprano de los tumores para demostrar efectos terapéuticos robustos, según el diseño del experimento inicial. Sin embargo, dada la penetración tisular superior de HAC PD-1 y su capacidad para bloquear interacciones PD-1:PD-L1 sin inducir el agotamiento contraproducente de las células T circulantes, se planteó la hipótesis de que sus ventajas en comparación con los anticuerpos podrían ser más evidentes cuando se intenta tratar tumores más grandes y más desafiantes. Con este fin, se inició un experimento en el que ratones Balb/c fueron injertados con células CT26, y su volumen tumoral fue monitoreado diariamente; solo cuando un tumor individual alcanzó un volumen mínimo de 150 mm³, o aproximadamente tres veces el tamaño inicial promedio del experimento anterior, el ratón huésped fue aleatorizado en una cohorte y se inició el tratamiento. Este simple cambio en el protocolo experimental tuvo profundos efectos sobre la eficacia comparativa de estos agentes. Mientras que el anticuerpo anti-PD-L1 y HACmb fueron equivalentes en el tratamiento de tumores CT26 muy pequeños (Fig. 10B), en el caso de tumores más grandes, incluso la inyección diaria de anticuerpo anti-PD-L1 no logró registrar ninguna eficacia medible sobre el tratamiento con PBS (Fig. 10D, izquierda, $p = 0,464$). En marcado contraste, HACmb redujo significativamente el crecimiento tumoral en tumores grandes durante la duración del estudio, en comparación con cualquiera de los tratados con PBS (Fig. 10D, derecha, $p < 1 \times 10^{-4}$) o ratones tratados con anticuerpos (Fig. 10D, izquierda, $p < 1 \times 10^{-4}$).

A continuación, se probó si la eficacia superior de HACmb como monoterapia se extendería en la configuración de combinación (p. ej., con anticuerpos anti-CTLA4). Por sí sola, la terapia con anticuerpos anti-CTLA4 fue efectiva en este modelo de tumor grande, retrasando el crecimiento de tumores en relación con el tratamiento con PBS (Fig. 10D, izquierda y derecha, $p < 1 \times 10^{-4}$); sin embargo, el tratamiento conjunto con el anticuerpo anti-PD-L1 junto con el anticuerpo anti-CTLA4 no produjo ningún beneficio adicional sobre el anti-CTLA4 solo (Fig. 10D, izquierda, $p = 0,756$). En contraste, HACmb mejoró la terapia anti-CTLA4, ya que los ratones tratados con una combinación de anti-CTLA4 y HACmb tenían tumores significativamente más pequeños en comparación con cualquiera de HACmb (Fig. 10D, $p = 0,012$), o anti-CTLA4 solo (Fig. 10D, $p = 0,006$).

En resumen, estos estudios *in vivo* demuestran que HAC PD-1 es eficaz en el tratamiento de tumores singénicos de ratón. Es importante destacar que los resultados ilustran que los aumentos en el tamaño del tumor afectan desproporcionadamente la eficacia de los anticuerpos anti-PD-L1 (de hecho, los hacen ineficaces, una vez que los tumores han superado un cierto umbral de tamaño), mientras que la proteína HAC-PD-1 sigue siendo eficaz en un modelo de tumor desafiante y clínicamente más realista. Por lo tanto, esta observación sugiere que los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1 pueden no capturar completamente el beneficio terapéutico máximo del bloqueo PD-1:PD-L1, y que son posibles mejoras adicionales con agentes terapéuticos optimizados.

Detección *in vivo* de la expresión de PD-L1 por Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) con HAC-PD-1 radioetiquetado con ⁶⁴Cu. La expresión de PD-L1 en el tumor se ha sugerido como un biomarcador potencial para predecir la respuesta a inmunoterapias dirigidas a PD-1- o PD-L1. En la actualidad, la expresión de PD-L1 en tumores se evalúa con mayor frecuencia mediante biopsia seguida de tinción inmunohistoquímica. Sin embargo, además del

riesgo asociado y las contraindicaciones del procedimiento de biopsia, el análisis de tejido resultante se complica por el patrón de expresión espacial heterogéneo de PD-L1 dentro de un tumor. "InmunoTEP" puede proporcionar un medio no invasivo para medir la expresión de PD-L1 en todo un tumor simultáneamente, sin la necesidad de extirpar ningún tejido. Se razonó que, debido a su alta afinidad y especificidad por PD-L1, así como a su mayor penetración en el tejido, un HAC-PD1 radioetiquetado podría servir como una sonda TEP efectiva para evaluar la expresión de PD-L1 en el tumor.

Para desarrollar un trazador TEP basado en el andamio HAC-PD-1, una variante mutada, HAC-N91C, se conjugó con el quelato bifuncional reactivo con tiol DOTA-maleimida²⁰. Mientras que la aparente afinidad por hPD-L1 de DOTA-HAC era más débil que su secuencia original HAC-V, DOTA-HAC, no obstante, antagonizó a hPD-L1 1.200 veces más potente que WT PD-1 (Fig. 17A). El radioetiquetado posterior con ⁶⁴Cu produjo la radio-proteína específica de hPD-L1 ⁶⁴Cu-DOTA-HAC, que poseía una actividad específica de 8-10 µCi por µg y una pureza radioquímica superior al 98 % (Fig. 17B). Este trazador TEP se utilizó para visualizar la expresión de hPD-L1 de todo el cuerpo en un ratón vivo.

⁶⁴Cu-DOTA-HAC mostró una fuerte señal tumor/músculo (mejora de 6 veces, $p < 0,05$) a 1 hora después de la inyección (Fig. 11A, Fig. 18A), con una alta captación en el riñón, lo indicando una rápida eliminación renal del fármaco libre de la sangre y una señal alta en el hígado, consistente con la unión específica del cobre por proteínas expresadas en el hígado (Fig. 18B, Fig. 18E). La falta de señal dentro de tumores negativos para PD-L1 (Fig. 11A, Fig. 18C), o en tumores positivos para hPD-L1 bloqueados por la inyección previa de 500 µg de HAC-PD1 frío (Fig. 11A-11B) indicó un alto grado de especificidad de ⁶⁴Cu-DOTA-HAC-PD1 para la unión de PD-L1. Se obtuvieron exploraciones adicionales a las 2, 4 y 24 horas (Fig. 18A, Fig. 18D), y se evaluó la biodistribución a las 24 horas (Fig. 19A-19B). La captación máxima del tumor se observó una hora después de la inyección, aunque persistió una fuerte señal dentro de tumores hPD-L1(+) por al menos 24 horas. En suma, la captación rápida y específica de ⁶⁴Cu-DOTA-HAC por el tumor hPD-L1(+) facilita su uso como reactivo en aplicaciones para la obtención de imágenes clínicas.

DISCUSIÓN

La inmunoterapia contra el cáncer es un paradigma de tratamiento cuyo notable potencial terapéutico apenas comienza a realizarse. Aunque se ha logrado el éxito en pacientes con cáncer con anticuerpos dirigidos al eje PD-1:PD-L1, los datos proporcionados aquí muestran que se puede lograr una eficacia adicional utilizando un señuelo del receptor PD-1 diseñado, HAC-PD-1. Esta proteína no comparte las limitaciones inherentes a los anticuerpos de pobre penetración tumoral y agotamiento no deseado de células T efectoras. En consecuencia, ejerce una actividad antitumoral mejorada en comparación con los anticuerpos anti-PD-L1 contra tumores más grandes y más expuestos. Por lo tanto, estos resultados resaltan el potencial de las pequeñas proteínas biológicas como agentes terapéuticos para los pacientes y su amplia aplicabilidad en la modulación del sistema inmune.

Además del suministro mejorado a los tumores, la naturaleza modular de las proteínas pequeñas como HAC-PD-1 permite una fácil combinación con otros agentes inmunoterapéuticos. Esta es una consideración clave a la luz de la eficacia del bloqueo combinado del control con nivolumab (anti-PD-1) e ipilimumab (anti-CTLA4) en pacientes con melanoma²¹ y numerosos estudios preclínicos que han demostrado sinergia entre anticuerpos dirigidos a PD-1/PD-L1 y vías inmunomoduladoras adicionales, tales como TIM-3²², LAG-3²³, GTR²⁴, OX-40²⁵, y 4-1BB²⁶. En el caso de HAC-PD-1, los agentes multiespecíficos que se dirigen a las vías inmunomoduladoras sinérgicas pueden elaborarse fácilmente simplemente fusionando múltiples módulos de proteínas pequeñas, incluidos otros señuelos de receptores diseñados o anticuerpos de dominio simple. Este diseño aprovecha la coexpresión de diferentes ligandos y/o receptores de control inmune en las mismas células para proporcionar avidez mejorada, y, por lo tanto, potencia, al agente combinado. Además, la terapéutica multiespecífica simplifica los regímenes de tratamiento al reducir el número de fármacos administrados por separado y, por extensión, reduce los costos asociados con su fabricación y desarrollo por separado.

Aunque generalmente se tolera bien en comparación con otros tratamientos contra el cáncer, los fármacos inmunomoduladores como los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 tienen toxicidades que van desde diarrea leve hasta eventos adversos relacionados con el sistema inmune que amenazan la vida, como hepatitis autoinmune, neumonitis, y colitis^{8,9}. Se necesitan con urgencia biomarcadores y procedimientos para identificar qué pacientes responderán al tratamiento para evitar toxicidad innecesaria en pacientes que de otro modo no se beneficiarían de la inmunoterapia. La expresión PD-L1 en el tumor por inmunohistoquímica (IHC) ha demostrado ser un predictor parcial, pero imperfecto, de la respuesta anti-PD-1/anti-PD-L1²⁷. Sin embargo, IHC puede ser una medida insensible de la expresión de PD-L1 en el tumor y es concebible que este procedimiento pueda caracterizar erróneamente los tumores positivos a PD-L1 como negativos. El trabajo presentado aquí demuestra que las imágenes de inmunoTEP HAC-PD-1 de la expresión de PD-L1 en el tumor se pueden usar como una alternativa a la inmunohistoquímica. Esta estrategia no invasiva permite obtener imágenes simultáneas de todo el tumor y metástasis asociadas, que pueden diferir del tumor primario

en el estado de expresión de PD-L1. Además, las imágenes de TEP se pueden usar para repetir las imágenes del mismo tumor en diferentes momentos (*p.ej.*, antes y después del tratamiento), lo que proporciona un conjunto más rico de información de diagnóstico que sería difícil o imposible de lograr con las estrategias tradicionales biopsia/IHC .

5 PROCEDIMIENTOS

Ratones. Los estudios en animales se realizaron de conformidad con la aprobación del Panel Administrativo sobre Cuidado de Animales de Laboratorio en la Universidad de Stanford. Ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad, utilizados para injertos de tumores singénicos y evaluación de los niveles de células T en respuesta a tratamientos, se obtuvieron directamente del Laboratorio Jackson. Ratones Nod.Cg-Prkdc.scid.IL2rg.tm1Wjl/SzJ (NSG), utilizados para evaluación *in vivo* de la penetración tumoral y estudios de TEP, se obtuvieron de poblaciones reproductoras internas.

Líneas celulares. La línea celular de melanoma humano SK-MEL-28, la línea celular de melanoma murino B16.F10 y la línea celular de carcinoma de colon murino CT26 se obtuvieron del ATCC. Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora humidificada, con 5 % de CO₂, a 37°C. Las células SK-MEL-28 se subcultivaron en medio EMEM (ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Thermo Fisher Scientific). Las células B16.F10 se subcultivaron en medio DMEM (Life Technologies) suplementado con FBS al 10 % y 55 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma). Se cultivaron células CT26 en RPMI suplementado con FBS al 10 %. Variantes genéticas de CT26 se crearon mediante la transducción simultánea de células CT26 con lentivirus que expresa Cas9 y un grupo lentiviral que codifica una mezcla de dos sgRNA dirigidos a mPD-L1 [secuencia GGCTCAAAGGACTTGTACG (SEQ ID NO: 56) y GGTCCAGCTCCCGTTCTACA (SEQ ID NO: 57), respectivamente], diseñado usando las herramientas en genome-engineering.org²⁸. A los 6 días después de la infección, las células fueron inducidas a expresar altos niveles de PD-L1 a través del tratamiento con 100 ng/mL de IFNγ de ratón, y a los 7 días después de la infección, las células se recogieron y se tiñeron con anticuerpo 10F.9G2 etiquetado con APC. La población negativa se clasificó, se cultivó y, varios días después de la recuperación del número de células, estas células se sometieron a dos rondas secuenciales adicionales de clasificación. Esta población negativa estable se definió como CT26-Δ(mPD-L1). Se generó lentivirus que codificaba para la expresión constitutiva de hPD-L1 dirigida por EF1A y se usó para infectar células CT26-Δ(mPD-L1) para generar una línea de cáncer de ratón que expresa PD-L1 humana. Estas células se recogieron, se tiñeron con PE-anti-PD-L1 (clon MIH1, eBioscience), y se clasificaron hasta pureza. Esta clasificación se repitió tres veces en total para generar la sublínea diseñada CT26-Tg (hPD-L1) -Δ(mPD-L1).

Expresión y purificación de proteínas. El dominio hPD-1 IgV (residuos 26-147), los dominios hPD-L1 IgV e IgC (residuos 19-239), las variantes PD-1 de alta afinidad y HACmb se ensamblaron como gBlocks mediante IDT y se clonaron en el marco en pAcGP67a con una etiqueta histidina 8x carboxi-terminal para la secreción de células *Trichoplusia ni* (High Five) usando baculovirus. La mutación N91C se introdujo en HAC-V usando mutagénesis dirigida al sitio mediada por PCR. La proteína secretada se purificó del medio acondicionado mediante cromatografía de ácido de níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) y se desaló en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las proteínas utilizadas para estudios funcionales o *in vivo* en ratones se sometieron adicionalmente a lavados en columna con Triton X-114 para eliminar la endotoxina. Las proteínas biotiniladas se obtuvieron mediante la adición de una secuencia de péptidos aceptores de biotina carboxi-terminal (GLNDIFEAKQIEWHE (SEQ ID NO: 58)) y biotinilación enzimática con ligasa BirA.

Etiquetado de proteínas con sondas reactivas con amina y cisteína. HAC-V N91C se expresó y purificó como se describió anteriormente y se redujo mediante la aplicación de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a una concentración final de 1 mM. La proteína reducida se combinó a continuación con un exceso molar de 20 veces de maleimida AlexaFluor 594 C5 (Life Technologies), maleimida AlexaFluor 647 C2 (Life Technologies), o maleimido-mono-amida-DOTA (MacroCyclics) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora y a continuación a 4°C durante 12 horas adicionales. La sonda libre de exceso se eliminó desalando la mezcla de reacción en PBS usando un concentrador de proteína VivaSpin (Sartorius Stedim). Para DOTA-HAC, la proteína reaccionada se intercambiaba en solución salina tamponada con Hepes (HBS; 10 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl) y se concentró a ~5 mg/mL. El número de quelantes acoplados por anticuerpo (*c/a*) se estimó con espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) en comparación de HAC-N91C sin reaccionar y HAC-DOTA.

Anti-hPD-L1 de baja endotoxina/sin azida (clon 29E.2A3, BioLegend) se etiquetó con un exceso molar de 8 veces de éster AlexaFluor 488 NHS durante dos horas a temperatura ambiente (Life Technologies). El colorante libre se inactivó mediante la adición de TRIS pH 8,0 a una concentración final de 20 mM y el anticuerpo etiquetado se desaló con un concentrador de proteína VivaSpin.

Visualización por levadura y evolución dirigida. Los dominios IgV de hPD-1 (residuos 26-147), los dominios IgV e

IgC de hPD-L1 (residuos 19-132) y hPD-L2 (residuos 20-123) se mostraron en la superficie de la cepa de *S. cerevisiae* EBY100 como fusiones N-terminales a Aga2 usando el vector pYAL como se describió previamente.

5 Construcción y selección de la biblioteca de hPD-1 de primera generación: Como todavía no se ha reportado una estructura cristalina de hPD-1 complejada con hPD-L1, se dedujeron 22 posibles residuos de contacto a través de la estructura de mPD-1 unida a hPD-L1 (PDB ID 3SBW). Se generó una biblioteca que aleatorizó estos residuos como se describe en la Fig. 12s1-12B, usando PCR de ensamblaje con los cebadores enumerados en la Tabla 2. La biblioteca tenía una diversidad teórica de aproximadamente $9,5 \times 10^{19}$ secuencias de proteínas únicas. Los productos de PCR se amplificaron adicionalmente con cebadores que contenían homología con el vector pYAL y se co-electroporaron junto
10 con pYAL linealizado en levadura EBY100. La biblioteca resultante contenía $0,9 \times 10^8$ transformantes.

La levadura transformada se recuperó y se expandió en medio SDCAA líquido a 30°C y se indujo por dilución 1:10 en medio SGCAA líquido y cultivado a 20°C durante 24 horas. Se utilizaron números apropiados de levadura inducida en cada ronda para asegurar una cobertura de al menos diez veces la diversidad esperada de la biblioteca en cada etapa,
15 y no menos de 10^8 células. Todas las etapas de selección se llevaron a cabo a 4°C usando tampón MACS (PBS con albúmina de suero bovino al 0,5 % y EDTA 2 mM). Antes de cada ronda, se realizó una limpieza previa contra estreptavidina-AlexaFluor 647 (producida internamente) con microperlas anti-Cy5/Alexa Fluor 647 (Miltenyi) y una columna LD MACS (Miltenyi). Para las rondas 1-3, la selección positiva se realizó etiquetando la levadura inducida con hPD-L1 biotinilada 1 µM durante una hora a 4°C, seguida de tinción secundaria con estreptavidina-AlexaFluor 647,
20 y selección magnética con microperlas anti-Cy5/AlexaFluor 647 y una columna LS MACS (Miltenyi). Para la cuarta ronda, la selección positiva se realizó mediante tinción con hPD-L1 biotinilado 10 nM y etiquetado secundario con estreptavidina-AlexaFluor 647. Los niveles de visualización se determinaron mediante tinción con anti-cMyc (Cell Signaling Technologies) conjugado con AlexaFluor 488 y el 1 % superior de ligantes de hPD-L1 normalizados para visualización se aislaron usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con un clasificador celular Aria
25 FACS. Después de cada ronda de selección, la levadura recuperada se expandió en medio SDCAA a 30°C durante la noche y a continuación se indujo a 20°C por dilución 1:10 en medio SGCAA durante 24 horas.

Construcción y selección de la biblioteca hPD-1 de segunda generación: La biblioteca de segunda generación fue diseñada para aleatorizar diez posiciones de contacto de la primera biblioteca que demostraron convergencia lejos del
30 residuo natural, así como siete posiciones centrales adicionales. El diseño, ilustrado por la Fig. 13, tenía una diversidad teórica de aproximadamente $9,1 \times 10^9$ secuencias de proteínas únicas. En cuanto a la biblioteca de primera generación, la biblioteca de segunda generación se construyó mediante PCR de ensamblaje con cebadores enumerados en la Tabla 3 y co-electroporada con pYAL en levadura EBY100. La biblioteca resultante produjo $1,2 \times 10^8$ transformantes.

35 La biblioteca de segunda generación se seleccionó de manera similar a la biblioteca de primera generación con algunas modificaciones. Las rondas 1-3 se realizaron mediante tinción con hPD-L1 biotinilado 1 µM y selección de perlas magnéticas como se describió anteriormente. Para las rondas 4 y 5, se realizó una selección cinética para seleccionar variantes con tasas de desactivación disminuidas. Brevemente, las levaduras se tiñeron con hPD-L1 biotinilado 10 nM durante una hora a 4°C. Después de lavar con tampón MACS, las levaduras se incubaron a
40 continuación con hPD-L1 nobiotinilado 1 µM durante seis horas a temperatura ambiente con agitación. Las levaduras postcompetidas se tiñeron a continuación con estreptavidina-AlexaFluor 647 y anti-cMyc conjugado con AlexaFluor 488 y el 1 % superior de aglutinantes normalizados para visualización se aislaron mediante clasificación FACS.

Resonancia de Plasmones Superficiales

45 Los experimentos se condujeron utilizando un Biacore T100 y se llevaron a cabo a 25°C. PD-L1 biotinilado se inmovilizó en un chip sensor (GE Healthcare) de estreptavidina (SA) de Biacore para producir una R_{max} de aproximadamente 100 RU. Una proteína biotinilada no relacionada (el dominio IgSF del CD47 humano) se inmovilizó en la superficie de referencia con un valor de RU correspondiente para controlar la unión no específica. Las mediciones
50 se realizaron con diluciones en serie de las variantes PD-1 en tampón HBS-P + (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, tensoactivo P20 al 0,005 %) como se indica en la figura 8A (GE Healthcare). La superficie de PD-L1 se regeneró mediante tres inyecciones de 60 segundos de 50 % v/v etilenglicol, glicina 100 mM pH 9,5. Se analizaron todos los datos con el software de evaluación Biacore T100 versión 2.0 con un modelo de unión Langmuir 1:1.

55 Ensayos de unión de competición celular con PD-1.

El tetrámero WT PD-1 se formó incubando WT PD-1 biotinilado con estreptavidina conjugada con AlexaFluor 647 a una ración molar de 4:1. La expresión de PD-L1 se indujo en células GFP-luciferasa+ SK-MEL-28 mediante simulación durante la noche con 2000 U/mL de IFN γ humano. El tetrámero WT PD-1 100 nM se combinó a continuación con
60 concentraciones de titulación de monómero WT PD-1, HAC-V o HACmb y se añadió simultáneamente a 100.000

células SK-MEL-28 inducidas. Las células se incubaron con las mezclas de reactivos en hielo durante 60 minutos y a continuación se lavaron para eliminar el tetrámero no unido. La intensidad de fluorescencia de AlexaFluor 647 se cuantificó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

5 Estudios de penetración tumoral *in vivo*.

Ratones Nod.Cg-Prkdc.scid.IL2rg.tm1Wjl/SzJ (NSG) hembra de 6-8 semanas de edad fueron inyectados subcutáneamente con 1×10^6 células de la línea de cáncer de colon genéticamente modificada CT26- Δ (mPD-L1) en su hombro izquierdo, y 1×10^6 células de CT26-Tg (hPD-L1)- Δ (mPD-L1) en su hombro derecho, en una suspensión de 50 μ L de 75 % RPMI (Life Technologies) y 25 % de matrigel de densidad media (Corning) para cada inyección. Después de 14 días, cuando los tumores habían crecido hasta aproximadamente 1 cm de diámetro, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una mezcla de 100 μ g de anticuerpo anti-PD-L1 conjugado con AlexaFluor 488 (clon 29E.2A3, BioLegend) y 100 μ g de monómero HAC PD-1 conjugado con conjugado AlexaFluor 594. Después de 4 horas, los ratones fueron sacrificados y sus tumores fueron disecados. Después de varias rondas de lavado con PBS frío para eliminar el exceso de sangre, cada tumor se cortó aproximadamente a la mitad. Una mitad se incubó en una solución de 1 % PFA en PBS durante la noche a 4°C con balanceo, lavado en PBS e incrustado en formulación Tissue Tek O.C.T. (Optimal Cutting Temperature = Temperatura de Corte Óptima) (Sakura). Se cortaron secciones congeladas de 7 micras de estos tejidos y se descongelaron durante 30 minutos, se lavaron en acetona a 4°C durante 4 minutos, se secaron al aire durante 10 minutos, se lavaron en PBS (tres veces, 5 minutos cada una) y se etiquetaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) antes de montar con Fluoromount G (Southern Biotech). Las transparencias se visualizaron en un microscopio fluorescente Eclipse e800 (Nikon) con un aumento de 10x o 20x. El procesamiento básico de fotos, que incluye colores falsos de fluorescencia, fusión de canales y ajuste de brillo y contraste, se realizó con Adobe Photoshop (Adobe). Para el análisis FACS, la segunda mitad de cada tumor se picó finamente con una cuchilla de afeitar recta, y el tejido picado se presionó a través de un filtro de malla de 100 μ M, se enjuagó con PBS y finalmente se pasó a través de un filtro de células de 40 μ M mientras estaba en suspensión líquida. Las muestras se mantuvieron lo más cerca posible de 4°C en todas las etapas del procesamiento. Finalmente, la suspensión unicelular resultante se fijó en una Solución de PFA 1 %, y se analizó la señal de fluorescencia derivada de anticuerpos y HAC en un analizador LSRFortessa FACS (BD Biosciences).

30 Estudios de agotamiento de células T

Ratones Balb/c hembra naturales de 6-8 semanas de edad se afeitaron en su dorso inferior y se inyectaron por vía subcutánea con 1×10^6 células de la línea CT26 de cáncer de colon en una suspensión de 50 μ L de 75 % RPMI (Life Technologies) y 25 % de matrigel de densidad media (Corning). Los ratones cuyos tumores no se injertaron dentro de los 7 días mediante inspección visual fueron excluidos del estudio adicional. Aquellos con tumores visibles y palpables se aleatorizaron en grupos de tratamiento, 10 ratones por grupo, usando las herramientas en random.org. Los ratones fueron tratados durante 3 días mediante inyecciones intraperitoneales una vez al día de 100 μ L de PBS, 250 μ g de anticuerpo anti-PD-L1 (clon 10F.9G2, BioXcell), o 250 μ g de proteína HACmb purificada, cada una ajustada a una concentración de 2,5 mg/mL. Después de tres días de tratamiento, se recogieron sangre periférica y ganglios linfáticos de cada ratón y se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos (BioLegend): AlexaFluor488 CD45 (clon 30-F11), PerCP-Cy5-5 CD8 (clon 53-6.7), AlexaFluor700 Nk1.1 (clon PK136), APC-Cy7 B220 (clon RA3-6B2), PE-Dazzle CD11b (clon M1/70), PE-Cy5 F4/80 (clon BM8), PE-Cy7 CD4 (GK1.5), y APC PD-L1 (clon 10F.9G2) DAPI se usó como una tinción de viabilidad. Las muestras se analizaron en un analizador de FACS LSRFortessa (BD Biosciences).

45 Modelos de tumor CT26

Ratones Balb/c hembra naturales de 6-8 semanas de edad se afeitaron en su dorso inferior y se inyectaron por vía subcutánea con 1×10^6 células de la línea CT26 de cáncer de colon en una suspensión de 50 μ L de 75 % RPMI (Life Technologies) y 25 % de matrigel de densidad media (Corning). Los ratones cuyos tumores no se injertaron dentro de los 7 días mediante inspección visual fueron excluidos del estudio adicional. Para estudios de tratamiento de tumores pequeños, los ratones se aleatorizaron en cohortes usando las herramientas de aleatorización de la lista en random.org, y los tratamientos se administraron a partir de 7 días después del injerto para todos los ratones. En estos estudios de tumores pequeños, se tomaron mediciones de calibre digital cada tercer día, y los valores se representaron gráficamente como cambio del número de veces, como normalizado a los valores medidos en el día 10. Para estudios de tumores grandes, los ratones se injertaron como se describió anteriormente, y comenzando en el día 8, los tumores se midieron diariamente. Los ratones se clasificaron individualmente en cohortes de tratamiento y el tratamiento se inició solo cuando los tumores alcanzaron un umbral de 150 mm³, aproximadamente 10-14 días después del injerto en todos los casos. Se tomaron mediciones de calibre digital todos los días para cada ratón en el experimento de tumor grande durante la duración del tratamiento. Para reducir la variabilidad aleatoria del día a día en los valores medidos, los volúmenes de tumores graficados en este experimento son promedios evaluados dentro de una ventana

deslizante que incluye el día actual, el día anterior y las mediciones del día siguiente. Los valores del estudio de tumores grandes se graficaron como volumen tumoral absoluto (mm^3). En ambos experimentos, los ratones recibieron inyecciones de tratamiento diarias por vía intraperitoneal durante 14 días con 100 μl de PBS, 250 μg de anticuerpo anti-PD-L1 (clon 10F.9G2, BioXcell) o 250 μg de proteína HACmb purificada, cada una ajustada a una concentración de 2,5 mg/mL. Los tumores se aproximaron como elipsoides con dos radios x e y , donde x es la dimensión medible más grande del tumor e y es la dimensión inmediatamente perpendicular a x : $\text{Volumen} = (4/3) * (\pi) * (x/2) * (y/2)^2$.

Etiquetado con **^{64}Cu de DOTA-HAC**. DOTA-HAC se radioetiquetó con $^{64}\text{CuCl}_2$ (Universidad de Wisconsin, Madison): 500 μg de DOTA-HAC en 200 μl de tampón de acetato amónico 0,1 mM (pH 5,5) se hizo reaccionar con ~ 370 MBq (~ 10 mCi) de solución neutralizada de $^{64}\text{CuCl}_2$ a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, se añadieron 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 7,0 a temperatura ambiente durante 15 minutos para recoger $^{64}\text{CuCl}_2$ no quelado en la mezcla de reacción. La purificación de ^{64}Cu -DOTA-HAC se realizó utilizando una HPLC SEC 3000 con una tasa de flujo de 1,0 mL/min (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0). La pureza radioquímica se evaluó por radio-HPLC. La dosis final de radioconjugado se pasó a través de un filtro de 0,2 μm a un vial estéril.

15

Ensayo de unión a célula radiotrazadora

Se realizó un ensayo de unión celular *in vitro* usando células hPDL1 (+), células hPDL1 (+) prebloqueadas con HAC-V y células hPDL1(-) de control para evaluar la inmunorreactividad. $2,5 \times 10^5$ células en 0,1 mL se dividieron en alícuotas por triplicado y se lavaron con PBSA (PBS suplementado con 1 % de albúmina de suero bovino). Cada tubo se incubó con 0,1 ml, 5 nmol/L ^{64}Cu -DOTA-HAC (5-6 MBq/nmol) por 45 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con 1 % PBSA. La actividad en cada pastilla celular se cuantificó usando un contador gamma (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin-Elmer).

25 Imágenes micro-TEP de animales pequeños. Ratones NSG con tumores CT26 subcutáneos hPDL1 positivos ($n=4$) o hPDL1 negativos ($n=4$) fueron inyectados por vía intravenosa con ^{64}Cu -DOTA-HAC ($\sim 230 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{g}$ proteína/200 μl PBS). Un grupo también recibió una dosis de bloqueo ($n=2$) de 500 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ HAC frío dos horas antes de la inyección del radiotrazador TEP. Los ratones se anestesiaron y se tomaron imágenes en un sistema TEP/TC de multimodalidad de animales pequeños Siemens Inveon (Preclinical Solutions; Siemens Healthcare) en los instantes de tiempo de 1, 30 2, 4 y 24 horas después de la inyección. Se obtuvieron imágenes sin procesar de TC en la posición del segundo lecho a 80 kVp/500 μA , media exploración 220° de rotación, 120 proyecciones por posición del lecho, con una fuente de rayos X de haz cónico (tamaño de punto focal de 50- μm) y un detector de rayos X de 2.048 x 3.072 píxeles. Los conjuntos de datos de TC se reconstruyeron usando un filtro Shepp-Logan y retroproyección filtrada por haz cónico. Sobre la base de la corrección de la atenuación de las tomografías computarizadas, se obtuvieron imágenes TEP 35 estáticas con la ventana de tiempo de coincidencia predeterminada de 3,4 ns y la ventana de energía de 350 t0 650 keV. Se eligieron tiempos de adquisición de exploración TEP de 3 minutos (1, 2 horas), 5 minutos (4 horas) y 10 minutos (24 horas) en función del tiempo posterior a la inyección. Los conjuntos de datos de TEP se reconstruyeron utilizando el algoritmo de maximización de expectativas de subconjuntos ordenados bidimensionales (OSEM 2D)²⁹. El análisis de imágenes se realizó utilizando el Inveon Research Workspace (IRW). Para cada exploración microTEP, se 40 dibujaron regiones de interés (ROI) tridimensionales sobre el hígado, el bazo, los riñones y el tumor en imágenes de cuerpo entero con corrección para desintegración. El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g) en cada órgano se obtuvo dividiendo el valor medio de píxeles en la región de interés (ROI; nCi/cc) por la dosis total inyectada. No se realizó corrección de volumen parcial. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA bidireccional (GraphPad).

45

Estudios de biodistribución. Después de completar las imágenes por micro-TEP/TC en el punto de tiempo de 24 horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados y disecados para biodistribución. Se recogieron y pesaron sangre y órganos (corazón, pulmones, hígado, bazo, páncreas, estómago, intestino delgado, intestino grueso, riñón, músculo, hueso, médula ósea, piel, cerebro, tumor y cola). Los valores de CPM para cada órgano a partir de las 50 mediciones del contador gamma se convirtieron en por ciento de dosis inyectadas por gramo de tejido. Los datos se corrigieron para desintegración al tiempo de inyección.

Tablas

55 **Tabla 2.** Cebadores utilizados para crear la biblioteca PD-1 de "Primera generación"

| Cebador | Secuencia (5' a 3') | SEQ ID NO: |
|----------|---------------------------------|------------|
| D1aff_1F | CATTTTCAATTAAGATGCAGTTACTTCGCTG | 59 |

ES 2 819 451 T3

| Cebador | Secuencia (5' a 3') | SEQ ID NO: |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| D1aff_2R | AATAACAGAAAATATTGAAAAACAGCGAAGTAACTGCATCT TAATTG | 60 |
| D1aff_3F | TTACTTCGCTGTTTTTCAATATTTTCTGTTATTGCTAGCGTT TTAGCAG | 61 |
| D1aff_4R | GTCTATCTGGGGAATCTGCTAAAACGCTAGCAATAACAGA AAAT | 62 |
| D1aff_5F | TTTTAGCAGATTCCCCAGATAGACCATGGAACCCACCAAC | 63 |
| D1aff_6R | CAACAAAGCTGGGGAGAAAAGTTGGTGGGTTCCATGGTC | 64 |
| D1aff_7F | AACTTTCTCCCCAGCTTTGTTGGTCGTCCTGAAGGTGA | 65 |
| D1aff_8R | GAACAAGTGAAAGTAGCGTTATCACCTCAGTGACGACCA A | 66 |
| D1aff_9F | GTGATAACGCTACTTTCCTTGTTCCTTCTCCAACACTTCC | 67 |
| D1aff_10R | GAAGGATTCGGAAGTGTGGAGAAGGAACA | 68 |
| D1aff_11F | CAACACTTCCGAATCCTTCNDTTTGRWTTGGHWTAGAVW GTCCCAVNTNDTWWWVYNTDVTNATTGGCTNHHTTCCCA GAAGATAGATCC | 69 |
| D1aff_12R | GAGTGACTCTGAATCTAGCATCTKGAHNTGGTNBGGATCT ATCTTCTGGGAAA | 70 |
| D1aff_13F | AGATGCTAGATTCAGAGTCACTCAATTGCCAAAC | 71 |
| D1aff_14R | GGACATGTGGAATCTCTACCGTTTGGCAATTGAGTGACT CTGA | 72 |
| D1aff_15F | CGGTAGAGATTTCCACATGTCCGTCGTCAGAGCTAGAAGA AACG | 73 |
| D1aff_16R | GTAAGTACCGGAATCGTTTCTTCTAGCTCTGACGAC | 74 |
| D1aff_17F | GAAACGATTCCGGTACTTACNWTTGTGGTGCTATTNCTND TNHTSCTVNANYTCAAATTAAGVRWTCCTTGAGAGCTGAAT TGAG | 75 |
| D1aff_18R | GGATCCTCTTTCAGTGACTCTCAATTCAGCTCTCAAGGA | 76 |
| D1aff_19F | ATTGAGAGTCACTGAAAGAGGATCCGAACAAAAGCTTATC | 77 |
| D1aff_20R | CAAGTCTTCTCGGAGATAAGCTTTTGTTCGGATCCTCTT | 78 |
| D1aff_21F | AAAGCTTATCTCCGAAGAAGACTTGGGTGGTGGTGG | 79 |
| D1aff_22R | CCACCAGATCCACCACCACCCAAGTC | 80 |

Tabla 3. Cebadores utilizados para crear la biblioteca PD-1 de "Segunda Generación"

| Cebador | Secuencia (5' a 3') | SEQ ID NO: |
|--------------|-----------------------------------------------------|------------|
| 1F_AffMat_G2 | CATTTTCAATTAAGATGCAGTTACTTCGCTG | 81 |
| 2R_AffMat_G2 | AATAACAGAAAATATTGAAAAACAGCGAAGTAACTGC ATCTTAATTG | 82 |

ES 2 819 451 T3

| Cebador | Secuencia (5' a 3') | SEQ ID NO: |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3F_AffMat_G2 | TTACTTCGCTGTTTTTCAATATTTTCTGTTATTGCTAG CGTTTTAGCAG | 83 |
| 4R_AffMat_G2 | GTCTATCTGGGAATCTGCTAAAACGCTAGCAATAA CAGAAAAT | 84 |
| 5F_AffMat_G2 | TTTTAGCAGATTCCCCAGATAGACCATGGAACCCAC CAAC | 85 |
| 6R_AffMat_G2 | CAACAAAGCTGGGGAGAAAGTTGGTGGGTTCCATGG TC | 86 |
| 7F_AffMat_G2 | AACTTTCTCCCAGCTTTGTTGGTCGTCCTGAAGGT GA | 87 |
| 8R_AffMat_G2 | GAACAAGTGAAAGTAGCGTTATCACCTTCAGTGACG ACCAA | 88 |
| 9F_AffMat_G2 | GTGATAACGCTACTTTCACTTGTTCCTTCTCCAACAC TTCC | 89 |
| 10R_AffMat_G2 | GAAGGATTCGGAAGTGTTGGAGAAGGAACA | 90 |
| 11F_AffMat_G2 | CCAACACTTCCGAATCCTTCVTRNTTNWTTGGYWY DTSAWTCCCCATCCDRTCAAAGTATAMATTGGCTG CTTTCCAGAAG | 91 |
| 12R_AffMat_G2 | GACCTGGTTGGGATCTATCTTCTGGGAAAGCAGCCA AT | 92 |
| 13F_AffMat_G2 | GAAGATAGATCCCAACCAGGTCMAGATGCTAGATTC AGARYTACTCAATTGCCAAACGGTAGAG | 93 |
| 14R_AffMat_G2 | CTTCTAGCTCTGACGACGGASANGTGAAAATCTCTA CCGTTTGGCAATTGAG | 94 |
| 15F_AffMat_G2 | TCCGTCGTCAGAGCTAGAAGAAACGATTCCGGTACT | 95 |
| 16R_AffMat_G2 | GCTCTCAAGGATTCCTTAATTTGAANCTTTGGAGCA WRGGAAATARYACCACAAANAWRAGTACCGGAATC GTTTCTTCTAGC | 96 |
| 17F_AffMat_G2 | TTCAAATTAAGGAATCCTTGAGAGCTGAATTGAGAGT CAC | 97 |
| 18R_AffMat_G2 | GTTCCGATCCTCTTTTCACTGACTCTCAATTCAGCTCT CAAG | 98 |
| 19F_AffMat_G2 | GTCCTGAAAGAGGATCCGAACAAAAGCTTATCTCC GAAGAAGAC | 99 |
| 20R_AffMat_G2 | CCACCAGATCCACCACCACCAAGTCTTCTTCGGAG ATAAGCTTTTG | 100 |

Tabla 4. Análisis estadístico de grupos de estudio de tumores grandes en el día 14 de tratamiento

| Comparación día 14 | Diferencia media | IC 95 % de dif. | ¿Significativo? | Resumen | Valor individual de P |
|---------------------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|---------|-----------------------|
| PBS vs. HACmb | 507,6 | 320,1 a 695,2 | Sí | **** | < 0,0001 |
| PBS vs. anti-PD-L1 | 69,97 | -117,6 a 257,5 | N.º | ns | 0,4636 |
| PBS vs. anti-CTLA4 | 480,7 | 293,2 a 668,3 | Sí | **** | < 0,0001 |
| PBS vs. anti-CTLA4+HACmb | 747,4 | 559,9 a 935,0 | Sí | **** | < 0,0001 |
| PBS vs. anti-CTLA4+ anti-PD-L1 | 510,4 | 322,8 a 697,9 | Sí | **** | < 0,0001 |
| HACmb vs. anti-PD-L1 | -437,7 | -625,2 a - 250,1 | Sí | **** | < 0,0001 |
| HACmb vs. anti-CTLA4 | -26,92 | -214,5 a 160,6 | N.º | ns | 0,7779 |
| HACmb vs. anti-CTLA4+HACmb | 239,8 | 52,21 a 427,3 | Sí | * | 0,0124 |
| HACmb vs. anti-CTLA4+ anti-PD-L1 | 2,740 | -184,8 a 190,3 | N.º | ns | 0,9771 |
| anti-PD-L1 vs. anti-CTLA4 | 410,8 | 223,2 a 598,3 | Sí | **** | < 0,0001 |
| anti-PD-L1 vs. anti-CTLA4+HACmb | 677,4 | 489,9 a 865,0 | Sí | **** | < 0,0001 |
| anti-PD-L1 vs. anti-CTLA4+ anti-PD-L1 | 440,4 | 252,9 a 628,0 | Sí | **** | < 0,0001 |
| anti-CTLA4 vs. anti-CTLA4+HACmb | 266,7 | 79,13 a 454,2 | Sí | ** | 0,0055 |
| anti-CTLA4 vs. anti-CTLA4+ anti-PD-L1 | 29,66 | -157,9 a 217,2 | N.º | ns | 0,7559 |
| anti-CTLA4+HACmb vs. anti-CTLA4+ anti-PD-L1 | -237,0 | -424,6 a - 49,47 | Sí | * | 0,0134 |

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Ring, Aaron M
 Kruse, Andrew C
 Manglik, Aashish
 Weissman, Irving L
 Maute, Roy L
 10 McCracken, Melissa N
 Gordon, Sydney

<120> AGENTES PD-1 DE ALTA AFINIDAD Y PROCEDIMIENTOS DE USO

- 15 <130> STAN-1136WO2

<150> US 62/035,316
 <151> 2014-08-08

ES 2 819 451 T3

<150> US 62/150,789
 <151> 2015-04-21

5 <160> 104

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

15

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1                               5                               10                               15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
                               20                               25                               30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
                               35                               40                               45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
                               50                               55                               60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65                               70                               75                               80

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

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
                               100                              105                              110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
                               115                              120                              125
    
```

ES 2 819 451 T3

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 2

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 2

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro

ES 2 819 451 T3

50 55 60

Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 3

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 3

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 4

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65          70          75          80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 5

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

50 55 60

Gly Pro Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Leu Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 6

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 6

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Ile Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Leu Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 7

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Ile Trp His Leu Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65          70          75          80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 8

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 8

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

Ser Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
    
```


ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 10

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

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

Cys Lys Val Phe Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Thr Pro
          50          55          60

Asn Pro Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65          70          75          80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

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

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 11

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 11

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Leu Ile Trp Phe Arg Gln Ser Pro Leu
          35          40          45

Gly Gln Leu Phe Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Ile Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
| Arg Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp 65 70 75 80 | | |
| Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr 85 90 95 | | |
| Val Cys Gly Ala Ile Ser Tyr Ser Pro Glu Ile Gln Ile Lys Glu Ser 100 105 110 | | |
| Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg 115 120 | | |

<210> 12

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 12

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

15 <210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 13

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Arg Leu Val Trp His Arg Glu Ser Pro Gly
          35          40          45

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

Leu Pro Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65          70          75          80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Val Cys Gly Ala Ile Ala Phe His Pro Val Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 14

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 14

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Arg Leu Val Trp His Arg Glu Ser Pro Asn
          35          40          45

Asn His Ala Tyr Thr Leu Ala Leu Phe Pro Glu Asp Arg Ser Leu Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

50 55 60

Phe Pro Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Ile Cys Gly Ala Ile Thr Phe Asp Pro Arg Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 15

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 15

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Leu Val Trp His Arg Leu Ser Pro Val
35 40 45

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

Val Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

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

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 16

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Tyr Asp Ser Pro Ser
          35          40          45

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

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

Phe His Phe Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Ile Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 17

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 17

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Tyr Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

50 55 60

Gly Pro Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Phe Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Ile Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 18

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 18

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Ile Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

Cys Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
50 55 60

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

Phe His Phe Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Phe
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 19

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Ile Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

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

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

Phe His Phe Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Phe
          85          90          95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 20

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 20

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Arg Leu Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

50 55 60

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

Phe His Phe Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Phe
85 90 95

Val Cys Gly Ala Ile Ser Phe Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

<210> 21

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 21

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

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

Phe His Leu Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Phe
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 22

5

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

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

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

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Lys Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Val Cys Gly Ile Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 23

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 23

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Ile Ile Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
    
```

ES 2 819 451 T3

```

50                    55                    60

Gly Pro Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65                    70                    75                    80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85                    90                    95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100                   105                   110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115                    120

```

<210> 24

<211> 253

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 24

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1                    5                    10                    15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20                   25                   30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35                   40                   45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65                   70                   75                   80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85                   90                   95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100                  105                  110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp
115                  120                  125

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly
130                  135                  140

```

ES 2 819 451 T3

Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
145 150 155 160

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
165 170 175

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
180 185 190

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
210 215 220

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
225 230 235 240

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 25

<211> 349

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 25

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

ES 2 819 451 T3

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Ala Ala Ala Pro Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 165 170 175

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 260 265 270

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 26
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

5 <400> 26

Ala
1 5 10

<210> 27

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 27

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

Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn
20 25 30

Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe
35 40 45

Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr
50 55 60

Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg
65 70 75 80

Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro
85 90 95

Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
100 105 110

20

<210> 28

<211> 91

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 28

30

ES 2 819 451 T3

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

<210> 29
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

10 <400> 29

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

15 <210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

5 <400> 30

```

Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys
1           5           10           15

Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met
           20           25           30

Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg
           35           40           45

Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn
           50           55           60

Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser
65           70           75           80

Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile
           85           90           95

Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu
           100          105
    
```

<210> 31

10 <211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 31

```

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
1           5           10           15

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

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
           35           40           45

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
50           55           60

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala
65           70           75
    
```

20

<210> 32

<211> 95

ES 2 819 451 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 32

```

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

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
                20                    25                30

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
                35                    40                45

Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
50                    55                60

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
65                    70                75                80

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
                85                    90                95
    
```

10
 <210> 33
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 33

20

```

Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys
1                    5                      10                15

Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met
                20                    25                30

Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg
35                    40                45

Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn
50                    55                60

Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser
65                    70                75                80

Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala
                85
    
```

ES 2 819 451 T3

<210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 34

10

```

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

Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn
                20           25           30

Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe
                35           40           45

Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr
    50           55           60

Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg
65           70           75           80

Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro
                85           90           95

Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu
                100           105           110
  
```

<210> 35
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

20

<400> 35

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1           5           10           15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
  
```


ES 2 819 451 T3

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> 37
<211> 176
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 819 451 T3

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 37

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

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

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
35 40 45

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
50 55 60

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
65 70 75 80

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
85 90 95

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
100 105 110

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
115 120 125

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
130 135 140

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
145 150 155 160

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
165 170 175

5

<210> 38

<211> 273

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15 <400> 38

ES 2 819 451 T3

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

ES 2 819 451 T3

Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
 260 265 270

Ile

<210> 39

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 39

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
 35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 130 135 140

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 145 150 155 160

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe
 165 170 175

ES 2 819 451 T3

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 180 185 190

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 195 200 205

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 210 215 220

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 225 230 235 240

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 245 250 255

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 260 265

<210> 40

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 40

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
 35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Gly Gly Ser Gly

ES 2 819 451 T3

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met
 130 135 140

Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu
 145 150 155 160

Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly
 165 170 175

Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly
 180 185 190

Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Met Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly
 195 200 205

Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Met Pro Leu Arg
 210 215 220

Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro
 225 230 235 240

Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu
 245 250 255

Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu
 260 265 270

Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
 275 280 285

Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
 290 295

<210> 41

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 41

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30

ES 2 819 451 T3

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
 35 40 45
 Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
 130 135 140
 Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
 145 150 155 160
 Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
 180 185 190
 Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
 195 200 205
 Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
 210 215 220
 Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
 225 230 235 240
 His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
 245 250 255
 Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
 260 265 270
 Phe Gly Leu Leu Lys Leu

275

ES 2 819 451 T3

<211> 244
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética
 <400> 42

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1           5           10           15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20           25           30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35           40           45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65           70           75           80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85           90           95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115          120          125

Gly Gly Gly Ser Trp Asn Ile His Gly Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln
130          135          140

Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro
145          150          155          160

Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val
165          170          175

Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg
180          185          190

Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser Phe Phe Ile Leu His
195          200          205
    
```

10

ES 2 819 451 T3

Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala
210 215 220

Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr Val
225 230 235 240

Thr Asp Val Lys

<210> 43

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 43

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala
130 135 140

Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro
145 150 155 160

ES 2 819 451 T3

Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val
165 170 175

Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu
195 200 205

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

Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys
225 230 235

<210> 44

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 44

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
35 40 45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Cys Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
115 120

15 <210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 819 451 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

5 <400> 45

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65          70          75          80

Phe His Met Ser Val Val Cys Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
          100          105          110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg
          115          120
    
```

<210> 46

10 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 46

```

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
1          5          10          15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
          20          25          30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser
          35          40          45
    
```

20

ES 2 819 451 T3

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

Gly Gln Asp Ala Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Cys
115 120

<210> 47

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 47

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 48

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

25

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

35 <400> 49

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 50

40 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

5

<400> 50

Gly Gly Ser Gly
1

10 <210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 51

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

20

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

30 <400> 52

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 53

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 53

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

45

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 54

55

ES 2 819 451 T3

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 55
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos sintética
10
<400> 55

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

15 <210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 56

25 ggctcaaag gactgtacg 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

35 <400> 57

gtccagctc ccgttctaca 20

<210> 58
40 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Secuencia sintética

<400> 58

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

50
<210> 59
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 59

5 catttcaat taagatgcag ttactcgct g 31

<210> 60
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 60

15 aataacagaa aatattgaaa aacagcgaag taactgcac ttaattg 47

<210> 61
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética

25 <400> 61

ttactcgct gttttcaat atttctgtt atgctagcg ttttagcag 49

30 <210> 62
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 62

40 gctatctgg ggaatctgct aaaacgctag caataacaga aaat 44

<210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia sintética

50 <400> 63

ttttagcaga ttcccagat agaccatgga acccaccaac 40

<210> 64
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia sintética

60 <400> 63

<400> 64

5 caacaaagct ggggagaaag ttggtgggtt ccatggtc 38

<210> 65
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 65

15 aactttctcc ccagctttgt tggctgtcac tgaaggta 39

<210> 66
 <211> 41
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

25 <400> 66

gaacaagtga aagtagcggt atcacctca gtagcagacca a 41

30 <210> 67
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 67

40 gtgataacgc tactttcact tgttccttct ccaacacttc c 41

<210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

50 <400> 68

gaaggattcg gaagtgttgg agaaggaaca 30

<210> 69
 55 <211> 91
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Secuencia sintética

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (48)..(48)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> n es a, c, g, o t
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(59)
 <223> n es a, c, g, o t
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (63)..(63)
 30 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (71)..(71)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 69
 caacacttcc gaatccttcn dtttgrwttg ghwttagavwg tccccavntn dtvwwvytnd 60
 40 tvnattggct nhsttcccag aagatagatc c 91
 <210> 70
 <211> 53
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t
 55 <220>
 <221> misc_feature

<222> (33)..(33)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 70

5 gagtgactct gaatctagca tctkgahntg gtnbggatct atcttctggg aaa 53

<210> 71

<211> 34

10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

15 <400> 71

agatgctaga ttcagagtca ctcaattgcc aaac 34

20 <210> 72

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia sintética

<400> 72

30 ggacatgtgg aaatctctac cgtttgcaa ttgagtgact ctga 44

<210> 73

<211> 44

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

40 <400> 73

cggtagagat ttccacatgt ccgctgctcag agctagaaga aacg 44

<210> 74

45 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia sintética

<400> 74

gtaagtaccg gaatcgttc ttctagctct gacgac 36

55

<210> 75

<211> 85

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Secuencia sintética

<220>
 5 <221> misc_feature

<222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>
 <221> misc_feature

<222> (36)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>
 <221> misc_feature

<222> (39)..(39)
 20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature

25 <222> (42)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature

30 <222> (49)..(49)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 35 <221> misc_feature

<222> (51)..(51)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <400> 75

gaaacgattc cggacttac nwtgtggtg ctatnctnd tnhtsctvna nytcaaatta 60

agvrwtcctt gagagctgaa ttgag 85

<210> 76
 45 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Secuencia sintética

<400> 76

ggatcctt tcagtgactc tcaattcagc tctcaagga 39

55 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 5 <400> 77
 attgagagtc actgaaagag gatccgaaca aaagcttatc 40
 10 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 78
 20 caagtctct tccgagataa gctttgttc ggcctctt 40
 <210> 79
 <211> 36
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 30 <400> 79
 aaagcttatc tccgaagaag actgggtgg tgggtg 36
 <210> 80
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia sintética
 <400> 80
 ccaccagatc caccaccacc caagtc 26
 45 <210> 81
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 81
 55 catttcaat taagatgcag ttacttcgct g 31
 <210> 82
 <211> 47
 60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 5 <400> 82
 aataacagaa aatattgaaa aacagcgaag taactgcatc ttaattg 47
 10 <210> 83
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 83
 20 ttactctgct gttttcaat atttctgtt attgctagcg ttttagcag 49
 <210> 84
 <211> 44
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 30 <400> 84
 gtctatctgg ggaatctgct aaaacgctag caataacaga aaat 44
 <210> 85
 35 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia sintética
 <400> 85
 ttttagcaga ttcccagat agaccatgga acccaccaac 40
 45 <210> 86
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 86
 55 caacaaagct ggggagaaag ttggtgggtt ccatggtc 38
 <210> 87
 <211> 39
 60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 5 <400> 87
 aactttctcc ccagctttgt tggcgtcac tgaaggta 39
 10 <210> 88
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 88
 20 gaacaagtga aagtagcgtt atcacctca gtagcgacca a 41
 <210> 89
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 30 <400> 89
 gtgataacgc tactttcact tgttccttct ccaacacttc c 41
 <210> 90
 35 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia sintética
 <400> 90
 gaaggattcg gaagtgttg agaaggaaca 30
 45 <210> 91
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 60 <220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 91

ccaacacttc cgaatccttc vrtnttnwtt ggywtydtsa wtcccatcc drtcaaactg 60

atamattggc tgctttccca gaag 84

10 <210> 92

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética

<400> 92

20 gacctggtg ggatctatct tctgggaaag cagccaat 38

<210> 93

<211> 64

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

30 <400> 93

gaagatagat cccaaccagg tcmagatgct agattcagar ytactcaatt gccaaacggt 60

agag 64

35

<210> 94

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia sintética

<220>

45 <221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n es a, c, g, o t

50 <400> 94

ctctagctc tgacgacgga sangtggaaa tctctaccgt ttggcaattg ag 52

<210> 95

55 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

5 <400> 95

tccgtcgtca gagctagaag aaacgattcc ggtact 36

10 <210> 96

<211> 83

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (26)..(26)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> n es a, c, g, o t

30 <400> 96

gctctcaagg attccttaat ttgaancttt ggagcawrgg aataryacc acaaanawra 60

gtaccggaat cgtttcttct agc 83

<210> 97

35 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia sintética

<400> 97

ttcaaattaa ggaatccttg agagctgaat tgagagtcac 40

45 <210> 98

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Secuencia sintética

<400> 98

55 gttcggatcc tcttcagtg actctcaatt cagctctcaa g 41

<210> 99

ES 2 819 451 T3

<211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 99

10 gtcactgaaa gaggatccga acaaaagctt atctccgaag aagac 45

<210> 100
 <211> 47
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética

20 <400> 100

ccaccagatc caccaccacc caagtcttct tcggagataa gcttttg 47

<210> 101
 <211> 7954
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> secuencia sintética

<400> 101

tgaagaccc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat 60

ggaaaataca taactgagaa tagagaagtt cagatcaagg ttaggaacag agagacagca 120

gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga 180

acagatggtc cccagatgcg gtcccgcctt cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt 240

ccaggggtgcc ccaaggacct gaaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt 300

35

ES 2 819 451 T3

cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc 360
 cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cgggtaccog tattcccaat 420
 aaagcctctt gctgtttgca tccgaatcgt ggactcgctg atccttggga gggctctcctc 480
 agattgattg actgcccacc tcgggggtct ttcatttggg ggtccaccg agatttggag 540
 accctcgctt agggaccacc gacccccccg ccgggaggtg agctggccag cggctcgttc 600
 gtgtctgtct ctgtctttgt gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg 660
 tactagttag ctaactagct ctgtatctgg cggaccogtg gtggaactga cgagtccgga 720
 acaccgggcc gcaaccctgg gagacgtccc agggacttcg ggggcccgtt ttgtggcccg 780
 acctgagtc taaaatcccg atcgttttag actctttggt gcacccccct tagaggaggg 840
 atatgtggtt ctggtaggag acgagaacct aaaacagttc ccgcctccgt ctgaatttt 900
 gctttcgggt tgggaccgaa gccgcgccgc gcgtcttgtc tgctgcagca tcgttctgtg 960
 ttgtctctgt ctgactgtgt ttctgtattt gtctgaaaat atgggcccgg gctagcctgt 1020
 taccactccc ttaagtttga ccttaggtca ctggaagat gtcgagcggg tcgctcacia 1080
 ccagtcggta gatgtcaaga agagacgttg gttaccttc tgctctgcag aatggccaac 1140
 ctttaacgtc ggatggccgc gagacggcac ctttaaccga gacctcatca cccaggttaa 1200
 gatcaaggtc ttttcaactg gccgcgatgg acaccagac caggtcccct acatcgtgac 1260
 ctggggaagc ttggcttttg acccccctcc ctgggtcaag ccctttgtac accctaagcc 1320
 tccgcctcct cttcctccat ccgcccogtc tctcccctt gaacctctc gttcgacccc 1380
 gcctcgatcc tccctttatc cagccctcac tccttctcta ggcgccccca tatggccata 1440
 tgagatctta tatggggcac ccccgcccct tgtaaacttc cctgaccctg acatgacaag 1500
 agttactaac agcccctctc tccaagctca cttacaggtt ctctacttag tccagcacga 1560
 agtctggaga cctctggcgg cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtaacctc 1620
 cccttaccga gtggcgaca cagtgtgggt ccgcccagac cagactaaga acctagaacc 1680
 tcgctggaaa ggaccttaca cagtctgctt gaccacccc accgcccctc aagtagacgg 1740
 catcgcagct tggatacacg ccgcccagct gaaggctgcc gaccccgggg gtggaccatc 1800
 ctctagaccg ccatgtaccg catgcaactt ttgtcctgta ttgtctgtc cctggccctc 1860
 gttaccaatt ctgactcccc agacaggcct tggaaaccac ccacctctc accagccctg 1920
 ttggtgggta ctgaggggga taatgctacc tttacttgca gcttcagcaa caccagtgaa 1980
 tcctttcatg tcgtctggca tagggagtcc ccctctgggc aaactgatac actggcagcc 2040
 ttccccgaag acagatctca gccaggccag gatgcccggg tccgagtgac tcagttgcca 2100
 aacggtcggg actttcacat gtctgttgtg cgggctcgga gaaatgacag cggcacttat 2160
 gtatgcggtg tgatctccct cgcaccaaag atccagataa aggaatctct gagggcagaa 2220

ES 2 819 451 T3

ctgagggtta ctgaaagagg atcataccca tacgatgttc cagattacgc tggctccgga 2280
 gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaacc cggccccgcg 2340
 gccgccatgg cgacgggttc aagaacttc ctacttcttg catttggcct gctttgtttg 2400
 ccgtggttac aggaagcctc agcacaacag aaggaggtgg agcagaattc tggaccctc 2460
 agtgttccag aggagccat tgcctctctc aactgcactt acagtgaccg aggttcccag 2520
 tccttcttct ggtcacagaca atattctggg aaaagccctg agttgataat gttcatatac 2580
 tccaatggtg acaaagaaga tgggaagttt acagcacagc tcaataaagc cagccagtat 2640
 gtttctctgc tcatcagaga ctcccagccc agtgattcag ccacctacct ctgtgccgtg 2700
 aacttcggag gaggaaagct tatcttcgga cagggaacgg agttatctgt gaaaccaat 2760
 atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag ctgagagact ctaaaccag tgacaagtct 2820
 gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat 2880
 gtgtatatca cagacaaatg cgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt 2940
 gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt 3000
 attccagaag acaccttctt ccccagccca gaaagttcct gtgatgtcaa gctggtcgag 3060
 aaaagctttg aaacagatac gaacctaaac tttcaaaacc tgtcagtgat tgggttccga 3120
 atcctcctcc tgaagtggc cgggtttaat ctgctcatga cgctgcggct gtggtcagc 3180
 agggcaaac gttcgggttc ggggtgcgcca gtaaagcaga cattaactt tgatttgctg 3240
 aaacttgca gtagttaga gtcaaatcca ggtccaatgg caacaggag ccgaacctct 3300
 ctgctccttg ctttcgggct cctttgccta ccgtgcctgc aggaggctc ggcagggatc 3360
 acccaggcac caacatctca gatcctggca gcaggacggc gcatgacact gagatgtacc 3420
 caggatatga gacataatgc catgtactgg tatagacaag atctaggact ggggctaagg 3480
 ctcatccatt attcaaatac tgcaggtacc actggcaaag gagaagtccc tgatggttat 3540
 agtgtctcca gagcaaacac agatgatctc ccctcacgt tggcgtctgc tgtaccctct 3600
 cagacatctg tgtacttctg tgccagcagc ctaagtttcg gcactgaagc tttctttgga 3660
 caaggcacca gactcacagt tntagaggac ctgaacaagg tgttcccacc cgaggtcgct 3720
 gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg 3780
 gccacaggct tcttcctga ccacgtggag ctgagctggt gggatgaatgg gaaggagtg 3840
 cacagtggg tctgcacgga cccgcagccc ctcaaggagc agcccgcct caatgactcc 3900
 agatactgcc tgagcagccg cctgagggtc tcggccacct tctggcagaa cccccgcaac 3960
 cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg ctctcggaga atgacgagtg gaccaggat 4020
 agggccaaac ccgtcaccca gatcgtcagc gccgaagcct ggggtagagc agactgtggc 4080

ES 2 819 451 T3

ttacctcgg tgcctacca gcaaggggtc ctgtctgcc ccatcctcta tgagatcctg 4140
 ctagggaagg ccaccctgta tgctgtgctg gtcagcgccc ttgtgttgat ggccatggtc 4200
 aagagaaagg atttctaaag gatccgataa aataaaagat tttatattag ctccagaaaa 4260
 aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttt 4320
 gcaagcatg gaaaatacat aactgagaat agagaagttc agatcaaggt taggaacaga 4380
 gagacagcag aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggtca 4440
 gggccaagaa cagatggtcc ccagatgagg tcccggcctc agcagtttct agagaacat 4500
 cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaatgacct gtgccttatt tgaactaacc 4560
 aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgctg gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc 4620
 ccacaacccc tcaactcggc cggcagtcct ccgatagact gcgtcgcccg ggtaccctg 4680
 tatccaataa accctcttgc agttgcatcc gacttgtggt ctgctgttc cttgggaggg 4740
 tctcctctga gtgattgact acccgtcagc gggggtcttt catgggtaac agtttcttga 4800
 agttggagaa caacattctg agggtaggag tcgaatatta agtaatcctg actcaattag 4860
 ccactgtttt gaatccacat actccaatac tcctgaaatc catcgatgga gttcattatg 4920
 gacagcgcag aaagagctgg ggagaattgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 4980
 acatacgagc cgggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 5040
 cattaattgc gttgctcaca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 5100
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggagc tcttccgctt 5160
 cctcgtcac tgactcgtg cgtcggctg ttcggctgag gcgagcggta tcagctcact 5220
 caaagcgggt aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag 5280
 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 5340
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc 5400
 cgacaggact ataaagatac cagggctttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctcctg 5460
 ttccgacct gcgcttacc ggatacctgt ccgcctttct ccctcggga agcgtggcgc 5520
 tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 5580
 gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgagc cttatccggt aactatcgtc 5640
 ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cggcactggc agcagccact ggtaacagga 5700
 ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 5760
 gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 5820
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgggt ggtttttttg 5880
 tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 5940
 ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcactgta agggattttg gtcagatgat 6000

ES 2 819 451 T3

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aatcaatct | 6060 |
| aaagtatata tgagtaaact tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta | 6120 |
| tctcagcgat ctgtctatth cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa | 6180 |
| ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac | 6240 |
| gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa | 6300 |
| gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag | 6360 |
| taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgctgc cattgctaca ggcatcgtgg | 6420 |
| tgtcacgctc gtcgtttgg atggcttcat tcagctccgg tccccaacga tcaaggcgag | 6480 |
| ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag cgttagctc cttcggctct ccgatcgttg | 6540 |
| tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc | 6600 |
| ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac | 6660 |
| tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata | 6720 |
| ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa | 6780 |
| aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca | 6840 |
| actgatcttc agcatctttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc | 6900 |
| aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc | 6960 |
| tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg | 7020 |
| aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac | 7080 |
| ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga | 7140 |
| ggccctttcg tctcgcgctt ttcgggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc | 7200 |
| cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg | 7260 |
| cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgccgcatca gagcagattg | 7320 |
| tactgagagt gcaccatatt cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc | 7380 |
| gcatcagggc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcgggtcggg | 7440 |
| cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg | 7500 |
| taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc acgctctccc | 7560 |
| ttatgcgact cctgcattag gaagcagccc agtagtaggt tgaggccggt gagcaccgcc | 7620 |
| gccgcaagga atggtgcatg caaggagatg gcgcccaaca gtccccggc cacggggcct | 7680 |
| gccaccatac ccacgccgaa acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc ccgatcttcc | 7740 |
| ccatcggatg tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgccg | 7800 |
| gccacgatgc gtccggcgta gaggcgattt aaagacagga tatcagtggt ccaggctcta | 7860 |

ES 2 819 451 T3

gttttgactc aacaatatca ccagctgaag cctatagagt acgagccata gataaaataa 7920
aagattttat ttagtctcca gaaaaagggg ggaa 7954

<210> 102

<211> 8856

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

10

<400> 102

ES 2 819 451 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| tgaaagacc | cacctgtagg | tttgcaagc | tagcttaagt | aacgccattt | tgcaaggcat | 60 |
| ggaaaataca | taactgagaa | tagagaagtt | cagatcaagg | ttaggaacag | agagacagca | 120 |
| gaatatgggc | caaacaggat | atctgtggta | agcagttcct | gccccggctc | agggccaaaga | 180 |
| acagatggtc | cccagatgcg | gtccccccct | cagcagtttc | tagagaacca | tcagatgttt | 240 |
| ccagggtgcc | ccaaggacct | gaaaatgacc | ctgtgcctta | tttgaactaa | ccaatcagtt | 300 |
| cgcttctcgc | ttctgttcgc | gcgcttctgc | tccccgagct | caataaaaga | gccacaacc | 360 |
| cctcactcgg | cgcgccagtc | ctccgataga | ctgcgtcgcc | cgggtaccog | tattcccaat | 420 |
| aaagcctctt | gctgtttgca | tccgaatcgt | ggactcgctg | atccttgga | gggtctctc | 480 |
| agattgattg | actgcccacc | tcgggggtct | ttcatttgga | ggttccaccg | agatttgag | 540 |
| accctgcct | agggaccacc | gaccccccg | ccgggaggtg | agctggccag | cggctgtttc | 600 |
| gtgtctgtct | ctgtctttgt | gcggtttgt | gccccatct | aatgtttgog | cctcgtctg | 660 |
| tactagttag | ctaactagct | ctgtatctgg | cggaccctg | gtggaactga | cgagttcgga | 720 |
| acaccggcc | gcaaccctgg | gagacgtccc | agggacttcg | ggggccgttt | ttgtggcccg | 780 |
| acctgagtcc | taaaatcccg | atcgtttagg | actctttggt | gcacccccct | tagaggaggg | 840 |
| atatgtggtt | ctggtaggag | acgagaacct | aaaacagttc | ccgcctccgt | ctgaattttt | 900 |
| gctttcgggt | tgggaccgaa | gccgcgccgc | gcgtcttgtc | tgctgcagca | tcgtctctgt | 960 |
| ttgtctctgt | ctgactgtgt | ttctgtattt | gtctgaaaat | atgggcccgg | gctagcctgt | 1020 |
| taccactccc | ttaagtttga | ccttaggtca | ctggaaagat | gtcgagcggg | tcgctcacia | 1080 |
| ccagtoggta | gatgtcaaga | agagacgttg | ggttaccttc | tgctctgcag | aatggccaac | 1140 |
| ctttaacgtc | ggatggccgc | gagacggcac | ctttaaccga | gacctcatca | cccagggtta | 1200 |
| gatcaaggtc | ttttcacctg | gccccatgg | acaccagac | caggccccct | acatcgtgac | 1260 |
| ctgggaagcc | ttggcttttg | acccccctcc | ctgggtcaag | ccctttgtac | accctaagcc | 1320 |
| tccgcctcct | cttctccat | ccgccccgct | tctccccctt | gaacctctc | gttcgacccc | 1380 |
| gcctcgatcc | tccctttatc | cagccctcac | tccttctcta | ggcgccccca | tatggccata | 1440 |
| tgagatctta | tatggggcac | ccccgccctt | tgtaaacctc | cctgaccctg | acatgacaag | 1500 |

ES 2 819 451 T3

agttactaac agcccctctc tccaagctca cttacaggct ctctacttag tccagcacga 1560
 agtctggaga cctctggcgg cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtagctca 1620
 cccttaccga gtcggcgaca cagtgtgggt ccgccgacac cagactaaga acctagaacc 1680
 togctggaaa ggaccttaca cagtctgctt gaccaccccc accgccctca aagtagacgg 1740
 catcgacgct tggatacacg ccgcccacgt gaaggctgcc gacccccggg gtggaccatc 1800
 ctctagaccg ccatgtcggg ggcaggctgc accggccgcg ccatggacgg gccgcgcctg 1860
 ctgctgttgc tgcttctggg ggtgtccctt ggagggtcca aggaggcatg cccacacggc 1920
 ctgtacacac acagcgggta gtgctgcaaa gcctgcaacc tgggcgaggg tgtggcccag 1980
 ccttgtggag ccaaccagac cgtgtgtgag ccctgcctgg acagcgtgac gttctccgac 2040
 gtgggtgagc cgaccgagcc gtgcaagccg tgcaccgagt gcgtggggct ccagagcatg 2100
 tcggcgccat gcgtggaggc cgacgacgcc gtgtgccgct gcgcctacgg ctactaccag 2160
 gatgagacga ctgggcgctg cgaggcgtgc cgcgtgtgcg aggcgggctc gggcctcgtg 2220
 ttctcctgcc aggacaagca gaacaccgtg tgcgaggagt gccccgacgg cacgtattcc 2280
 gacgaggcca accacgtgga cccgtgcctg ccctgcaccg tgtgcgagga caccgagcgc 2340
 cagctccgcg agtgcacacg ctgggcccgc gccgagtgcg aggagatccc tggccgttgg 2400
 attacacggt ccacaccccc agagggtcgc gacagcacag ccccagcac ccaggagcct 2460
 gaggcacctc cagaacaaga cctcatagcc agcacggtgg caggtgtggt gaccacagtg 2520
 atgggcagct cccagcccgt ggtgaccoga ggcaccaccg acaacctcat ccctgtctat 2580
 tgctccatcc tggctgctgt ggttgtgggt cttgtggcct acatagcctt caagaggtgg 2640
 aacagctccg gctccggagc caccaacttc agcctgctga agcaggccgg cgacgtggag 2700
 gagaaccccg gccccgcggc cgccatggcg acgggttcaa gaacttcctt acttcttgca 2760
 tttggcctgc tttgtttgcc gtggttacag gaagcctcag cacaacagaa ggagggtggag 2820
 cagaattctg gaccctcag tgttccagag ggagccattg cctctctcaa ctgcacttac 2880
 agtgaccgag gttcccagtc cttcttctgg tacagacaat attctgggaa aagccctgag 2940
 ttgataatgt tcatatactc caatggtgac aaagaagatg gaaggtttac agcacagctc 3000
 aataaagcca gccagtatgt ttctctgctc atcagagact cccagcccag tgattcagcc 3060
 acctacctct gtgccgtgaa cttcggagga gaaagctta tcttcggaca ggaacggag 3120
 ttatctgtga aaccaatat ccagaacct gaccctgccg tgtaccagct gagagactct 3180
 aatccagtg acaagtctgt ctgcctattc accgattttg attctcaaac aatgtgtca 3240
 caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca gacaaatgcg tgctagacat gaggtctatg 3300
 gacttcaaga gcaacagtcg tgtggcctgg agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac 3360

ES 2 819 451 T3

gccttcaaca acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccaga aagttcctgt 3420
gatgtcaagc tggtcgagaa aagctttgaa acagatacga acctaaactt tcaaaacctg 3480
tcagtgattg gggtccgaat cctcctcctg aaagtggccg ggtttaatct gctcatgacg 3540
ctgCGGctgt ggtccagcag ggcaaacgt tcgggttcgg gtgcgccagt aaagcagaca 3600
ttaaactttg atttgctgaa acttgcaggt gatgtagagt caaatccagg tccaatggca 3660
acagggagcc gaacctctct gctccttctt ttcgggctcc tttgcctacc gtgcctgcag 3720
gagggctcgg cagggatcac ccaggcacca acatctcaga tcctggcagc aggacggcgc 3780
atgacactga gatgtaccca ggatatgaga cataatgccca tgtactggta tagacaagat 3840
ctaggactgg ggctaaggct catccattat tcaataactg caggtaccac tggcaaaagga 3900
gaagtccctg atggttatag tgtctccaga gcaaacacag atgatttccc cctcacgttg 3960
gggtctgctg taccctctca gacatctgtg tacttctgtg ccagcagcct aagtttcggc 4020
actgaagctt tctttggaca aggcaccaga ctcacagttg tagaggacct gaacaagggtg 4080
ttcccacccc aggtcgtctg gtttgagcca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 4140
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc ttccttgacc acgtggagct gagctggtgg 4200
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacggacc cgcagcccct caaggagcag 4260
cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc 4320
tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 4380
gacgagtgga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccacaga tcgtcagcgc cgaagcctgg 4440
ggtagagcag actgtggctt tacctcggtg tcctaccagc aaggggtcct gtctgccacc 4500
atcctctatg agatcctgct agggaaggcc accctgtatg ctgtgctggt cagcgcctt 4560
gtgttgatgg ccatggtcaa gagaaaggat ttcggttctg gcgagggctg ggggtctctg 4620
ctgacctgcg gtgatgtcga ggaaaatcca ggtcccatgt accgcatgca acttttgtcc 4680
tgtattgctc tgtccctggc cctcgttacc aattctgact ccccagacag gccttggaac 4740
ccaccacact tctcaccagc cctgttggtg gtgactgagg gggataatgc tacctttact 4800
tgcagcttca gcaacaccag tgaatcctt catgtcgtct ggcataggga gtccccctct 4860
gggcaaacctg atacactggc agccttcccc gaagacagat ctcagccagg ccaggatgcc 4920
cggttccgag tgactcagtt gccaaacggt cgggacttcc acatgtctgt tgtgcgggct 4980
cggagaaatg acagcggcac ttatgtatgc ggtgtgatct ccctcgcacc aaagatccag 5040
ataaaggaaat ctctgagggc agaactgagg gttactgaaa gaggatcata cccatacgat 5100
gttccagatt acgcttaatg aggatccgat aaaataaaag attttattta gtctccagaa 5160
aaagggggga atgaaagacc ccacctgtag gtttggaag ctagcttaag taacgccatt 5220
ttgcaaggca tggaaaatac ataactgaga atagagaagt tcagatcaag gttaggaaca 5280

ES 2 819 451 T3

gagagacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggt 5340
cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgcc tcagcagttt ctagagaacc 5400
atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa 5460
ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga 5520
gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cgggtacccg 5580
tgtatccaat aaacctctt gcagttgcat ccgacttggt gtctcgtctg tccttgggag 5640
ggtctcctct gagtgattga ctaccctca gcgggggtct ttcattggga acagtttctt 5700
gaagttggag aacaacattc tgaggtagg agtogaatat taagtaatcc tgactcaatt 5760
agccactggt ttgaatccac atactccaat actcctgaaa tccatcgatg gagttcatta 5820
tggaacagc agaaagagct ggggagaatt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5880
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 5940
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 6000
gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 6060
ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcgggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 6120
ctcaaaggcg gtaatacgggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 6180
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgcttctgg cgttttcca 6240
taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 6300
ccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 6360
tgttccgacc ctgcoctta ccggatacct gtcgccttt ctccctcgg gaagcgtggc 6420
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6480
gggctgtgtg cacgaacccc ccgctcagc gcaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6540
tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6600
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 6660
cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg 6720
aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaccacc gctggtagcg gtggttttt 6780
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgcatt 6840
ttctacggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 6900
attatcaaaa aggatcttca ctagatcct ttaaattaa aatgaagtt taaatcaat 6960
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca tgcttaatca gtgaggcacc 7020
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 7080
aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 7140

ES 2 819 451 T3

acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 7200
 aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc ggaagctag 7260
 agtaagtagt togccagtta atagtttgcc caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 7320
 ggtgtcacgc togtcgtttg gtatggcttc attcagctcc gggtcccaac gatcaaggcg 7380
 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7440
 tgtcagaagt aagttggccg cagtgttata actcatgggt atggcagcac tgcataattc 7500
 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7560
 attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7620
 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gtcctatcatt ggaaaacggt ctccggggcg 7680
 aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgcacc 7740
 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aacaggaag 7800
 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7860
 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7920
 tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttccc gaaaagtgcc 7980
 acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 8040
 gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct 8100
 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 8160
 cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 8220
 tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata 8280
 ccgcatcagg ccgcatcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg 8340
 ggctctctcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg 8400
 ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaacg acggccagtg ccacgctctc 8460
 ccttatgcga ctctgcatt aggaagcagc ccagtagtag gttgagccg ttgagcaccg 8520
 ccgccgcaag gaatggtgca tgcaaggaga tggcgcccaa cagtcccccg gccacggggc 8580
 ctgccacat acccacgccc aaacaagcgc tcatgagccc gaagtggcga gcccgatctt 8640
 ccccatcggg gatgtcggcg atataggcgc cagcaaccgc acctgtggcg ccggtgatgc 8700
 cggccacgat cgcgtccggcg tagaggcgat ttaaagacag gatatcagtg gtccaggctc 8760
 tagttttgac tcaacaatat caccagctga agcctataga gtacgagcca tagataaaat 8820
 aaaagatfff atttagtctc cagaaaaagg ggggaa 8856

<210> 103

<211> 7902

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 819 451 T3

<223> secuencia sintética

<400> 103

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| tgaaagacc | cacctgtag | tttggcaag | tagcttaag | aacgccatt | tgcaaggcat | 60 |
| ggaaaataca | taactgagaa | tagagaagtt | cagatcaagg | ttaggaacag | agagacagca | 120 |
| gaatatgggc | caaacaggat | atctgtggta | agcagttcct | gccccggctc | agggccaaga | 180 |
| acagatggtc | cccagatgcg | gtcccgccct | cagcagtttc | tagagaacca | tcagatgttt | 240 |
| ccagggtgcc | ccaaggacct | gaaaatgacc | ctgtgcctta | tttgaactaa | ccaatcagtt | 300 |
| cgcttctcgc | ttctgttcgc | gcgcttctgc | tccccgagct | caataaaaga | gccacaacc | 360 |
| cctcactcgg | cgcgccagtc | ctccgataga | ctcgcgtcgc | cggttaccog | tattccaat | 420 |
| aaagcctctt | gctgtttgca | tccgaatcgt | ggactcgcctg | atccttggga | gggtctcctc | 480 |
| agattgattg | actgccacc | tcgggggtct | ttcatttggga | ggttccaccg | agatttggag | 540 |
| accctgcct | agggaccacc | gacccccccg | ccgggaggtg | agctggccag | cggtcgtttc | 600 |
| gtgtctgtct | ctgtctttgt | gctgtttgt | gccggcatct | aatgtttcgc | cctgcgtctg | 660 |
| tactagttag | ctaactagct | ctgtatctgg | cggaccctg | gtggaactga | cgagttcggg | 720 |
| acaccggcc | gcaaccctgg | gagacgtccc | agggacttcg | ggggccgttt | ttgtggcccg | 780 |
| acctgagtcc | taaaatcccg | atcgttttag | actctttggt | gcacccccct | tagaggagg | 840 |
| atatgtggtt | ctggtaggag | acgagaacct | aaaacagttc | ccgcctccgt | ctgaatttt | 900 |
| gctttcgggt | tgggaccgaa | gccgcgccgc | gctcttctgc | tgctgcagca | tcgttctgtg | 960 |
| ttgtctctgt | ctgactgtgt | ttctgtattt | gtctgaaaat | atgggcccgg | gctagcctgt | 1020 |
| taccactccc | ttaagtttga | ccttaggtca | ctggaaagat | gtcgagcggg | tcgctcacia | 1080 |
| ccagtcggta | gatgtcaaga | agagacgttg | ggttaccttc | tgctctgcag | aatggccaac | 1140 |
| ctttaacgtc | ggatggccgc | gagacggcac | ctttaaccga | gacctcatca | cccaggtaa | 1200 |
| gatcaaggtc | ttttcacctg | gcccgcattg | acaccagac | caggtcccct | acatcgtgac | 1260 |
| ctgggaagcc | ttggcttttg | acccccctcc | ctgggtcaag | ccctttgtac | accctaagcc | 1320 |
| tccgcctcct | cttctccat | ccgcccgcgc | tctccccctt | gaacctcctc | gttcgacccc | 1380 |
| gcctogatcc | tccctttatc | cagccctcac | tccttctcta | ggcgccccca | tatggccata | 1440 |
| tgagatctta | tatggggcac | ccccgcccct | tgtaaacctc | cctgaccctg | acatgacaag | 1500 |
| agttactaac | agcccctctc | tccaagctca | cttacaggct | ctctacttag | tccagcacga | 1560 |
| agtctggaga | cctctggcgg | cagcctacca | agaacaactg | gaccgaccgg | tggtacctca | 1620 |
| cccttaccga | gtcggcgaca | cagtgtgggt | ccgccgacac | cagactaaga | acctagaacc | 1680 |
| tcgctggaaa | ggaccttaca | cagtcctgct | gaccaccccc | accgccctca | aagtagacgg | 1740 |

5

ES 2 819 451 T3

catcgcagct tggatacacg ccgcccacgt gaaggctgcc gaccccgggg gtggaccatc 1800
 ctctagaccg ccatgtaccg catgcaactt ttgtcctgta ttgtctgtc cctggccctc 1860
 gttaccaatt ctgattcccc agatagacca tggaaaccac caactttctc cccagctttg 1920
 ttggtcgtca ctgaaggtga taacgctact ttcacttgtt ccttctcaa cacttccgaa 1980
 tccttccatg ttgtttggca tcgtgaatcc ccatccggtc aaactgatac attggctgct 2040
 ttcccagaag atagatccca accaggtcaa gatgctagat tcagagttac tcaattgcca 2100
 aacggtagag atttccacat gtccgtcgtc agagctagaa gaaacgattc cggtaacttat 2160
 gtttgtgggt ttatttccct tgctccaaag attcaaatta aggaatcctt gagagctgaa 2220
 ttgagagtca ctgaaagaga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 2280
 ggcggagggt ctagtggagg cggtagtgga ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 2340
 ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa 2400
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 2460
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 2520
 accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 2580
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aggatcatac 2640
 ccatacgatg ttccagatta cgctggctcc ggagccacca acttcagcct gctgaagcag 2700
 gccggcgacg tggaggagaa ccccgcccc ccgcccggca tgggtgtccc taccagctc 2760
 ctgggactgc tcctgctgtg gatcaccgac gccatctgcg acatccagat gaccagagc 2820
 cctgccagcc tgtctaccag cctgggcgag acagtgacca tccagtgtca ggccagcgag 2880
 gacatctact ctggcctggc ttggtatcag cagaagcccg gcaagagccc tcagctgctg 2940
 atctacggcg ccagcgacct gcaggacggc gtgcctagca gattcagcgg cagcggctcc 3000
 ggaaccagct acagcctgaa gatcaccagc atgcagaccg aggacgaggg cgtgtacttc 3060
 tgccagcaag gcctgacctc ccctagaacc ttcggaggag gcaccaagct ggaactgaag 3120
 ggcggaggcg gaagtggagg cggaggatct ggcggcggag gctctgaagt gcagctgcag 3180
 cagtctggcg ctgaaactggc ccggcctggc actagcgtga agctgtcctg caaggtgtcc 3240
 ggcgacacca tcaccttcta ctacatgcac ttcgtgaagc agaggccagg acagggcctg 3300
 gaatggatcg gcagaatcga ccctgaggac gagagcacca agtacagcga gaagttcaag 3360
 aacaaggcca ccctgaccgc cgacaccagc agcaacaccg cctacctgaa gctgtctagc 3420
 ctgacctccg aggacaccgc cacctacttt tgcactctac gcggctacta cttcgactac 3480
 tggggccagg gcgtgatggt caccgtgtcc agcatcgagt tcatgtaccc ccctccctac 3540
 ctggacaacg agagaagcaa cggcaccatc atccacatca aagaaaagca cctgtgccac 3600
 acccagagca gcccgaagct gttctgggcc ctgggtgtgg tggccggcgt gctgttctgt 3660

ES 2 819 451 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tacggcctgc | tggtcacagt | ggccctgtgc | gtgatctgga | ccaacagcag | aagaaacaga | 3720 |
| ggcggccaga | gcgactacat | gaacatgacc | cccagaaggc | caggcctgac | cagaaagccc | 3780 |
| taccagccct | acgccctgc | cagagacttc | gccgcctaca | gacccagagc | caagttcagc | 3840 |
| agatccgco | agacagccgc | caacctgcag | gaccctaacc | agctgttcaa | cgagctgaac | 3900 |
| ctgggcagac | gggaggaatt | tgacgtgctg | gaaaagaaga | gagccagggg | ccccgagatg | 3960 |
| ggcggcaagc | agcagagaag | aagaaacct | caggaaggcg | tctacaacgc | cctgcagaaa | 4020 |
| gacaagatgg | ccgaggccta | cagcgagatc | ggcaccaagg | gcgagagaag | aaggggcaag | 4080 |
| ggccacgatg | gcctgttcca | gggcctgtcc | accgccacca | aggacacctt | cgacgccttg | 4140 |
| cacatgcaga | ccctggcccc | cagatgagga | tccgataaaa | taaaagattt | tatttagtct | 4200 |
| ccagaaaaag | gggggaatga | aagaccccc | ctgtaggttt | ggcaagctag | cttaagtaac | 4260 |
| gccatthtgc | aaggcatgga | aaatacataa | ctgagaatag | agaagttcag | atcaaggtta | 4320 |
| ggaacagaga | gacagcagaa | tatgggcaa | acaggatata | tgtggttaagc | agttcctgcc | 4380 |
| ccggctcagg | gccaagaaca | gatggtcccc | agatgcggtc | ccgccctcag | cagtttctag | 4440 |
| agaaccatca | gatgtttcca | gggtgcccc | aggacctgaa | atgacctgt | gccttatttg | 4500 |
| aactaaccaa | tcagttcgct | tctcgcttct | gttcgcgcgc | ttctgctccc | cgagctcaat | 4560 |
| aaaagagccc | acaaccctc | actcggcgcg | ccagtcctcc | gatagactgc | gtcgcccggg | 4620 |
| taccctgtga | tccaataaac | cctcttgca | ttgcatccga | cttgtggtct | cgctgttcct | 4680 |
| tgggagggtc | tcctctgagt | gattgactac | ccgtcagcgg | gggtctttca | tgggtaacag | 4740 |
| tttcttgaag | ttggagaaca | acattctgag | ggtaggagtc | gaatattaag | taatcctgac | 4800 |
| tcaattagcc | actgttttga | atccacatac | tccaatactc | ctgaaatcca | tcgatggagt | 4860 |
| tcattatgga | cagcgcagaa | agagctgggg | agaattgtga | aattgttatc | cgctcacaat | 4920 |
| tccacacaac | atacgagccg | gaagcataaa | gtgtaaagcc | tggggtgcct | aatgagtgag | 4980 |
| ctaactcaca | ttaattgctg | tgcgctcact | gcccgctttc | cagtcgggaa | acctgtcgtg | 5040 |
| ccagctgcat | taatgaatcg | gccaacgcgc | gggagagagc | ggtttgctga | ttgggcgctc | 5100 |
| ttccgcttcc | tcgctcactg | actcgctgcg | ctcggctcgtt | cggctgcggc | gagcggtatc | 5160 |
| agctcactca | aaggcggtaa | tacggttatc | cacagaatca | ggggataacg | caggaaagaa | 5220 |
| catgtgagca | aaaggccagc | aaaaggccag | gaaccgtaaa | aaggccgcgt | tgctggcggtt | 5280 |
| tttccatagg | ctccgcccc | ctgacgagca | tcacaaaaat | cgacgctcaa | gtcagaggtg | 5340 |
| gogaaaccog | acaggactat | aaagatacca | ggcgthtccc | cctggaagct | ccctcgtgcg | 5400 |
| ctctcctggt | ccgaccctgc | cgcttacggg | atacctgtcc | gcctttctcc | cttcggggaag | 5460 |
| cgtggcgctt | tctcatagct | cacgctgtag | gtatctcagt | tcgggtgtagg | tcgthcgtc | 5520 |

ES 2 819 451 T3

caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccg tccagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa 5580
 ctatcgtctt gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg 5640
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggggcc 5700
 taactacggc tacaactagaa ggacagtatt tggatctctg gctctgctga agccagttac 5760
 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggga 5820
 tttttttgtt tgcaagcagc agattacgag cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 5880
 gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaa tcacgttaag ggattttggt 5940
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa 6000
 atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gcttgacagt taccaatgct taatcagtga 6060
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttct ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt 6120
 gtagataact acgatacggg agggcctacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgag 6180
 agaccacgac tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg gaagggccga 6240
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 6300
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 6360
 catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggttctctc agctccggtt cccaacgatc 6420
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 6480
 gatcgttgtc agaagtaagt tggccgagc gttatcactc atggttatgg cagcactgca 6540
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtaactaac 6600
 caagtcatc tggagaatagt gtatgcccgg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 6660
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc 6720
 gggggcaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcag 6780
 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 6840
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 6900
 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 6960
 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcccacat ttccccgaaa 7020
 agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg 7080
 tatcacgagg ccttttcgtc tcgcccgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat 7140
 gcagctcccg gagacggtca cagcttctct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg 7200
 tcaggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga 7260
 gcagattgta ctgagagtgc accatattcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 7320
 aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 7380
 ggtgcccggc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt 7440

ES 2 819 451 T3

aagtgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgccac 7500
gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag tagtaggttg aggccggtga 7560
gcaccgccgc cgcaaggaaat ggtgcatgca aggagatggc gcccaacagt cccccggcca 7620
cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat gagcccgaag tggcgagccc 7680
gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc aaccgcacct gtggcgccgg 7740
tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggcgatttaa agacaggata tcagtgggtcc 7800
aggctctagt tttgactcaa caatatcacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga 7860
taaaataaaa gattttattt agtctccaga aaaagggggg aa 7902

<210> 104

<211> 8805

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

10

<400> 104

tgaagaccc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat 60
ggaaaataca taactgagaa tagagaagtt cagatcaagg ttaggaacag agagacagca 120
gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga 180
acagatggtc cccagatgcg gtccccccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt 240
ccagggtgcc ccaaggacct gaaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt 300
cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc 360
cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcggc cgggtaccog tattcccaat 420
aaagcctctt gctgtttgca tccgaatcgt ggactcgtg atccttggga ggtctctctc 480
agattgattg actgccacc tcgggggtct ttcatttga ggttccaccg agatttggag 540
accctgcct agggaccacc gacccccccg ccgggaggtg agctggccag cgtcgtttc 600
gtgtctgtct ctgtctttgt gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg 660
tactagttag ctaactagct ctgtatctgg cggaccctg gtggaactga cgattcggga 720
acaccoggcc gcaaccctgg gagacgtccc agggacttcg gggccggtt ttgtggcccg 780
acctgagtcc taaaatcccg atcgtttagg actctttggt gcacccccct tagaggaggg 840
atatgtggtt ctggtaggag acgagaacct aaaacagttc ccgcctccgt ctgaatttt 900
gcttccggtt tgggaccgaa gccgcgccgc gcgtcttctc tgctgcagca tcgtctctgt 960
ttgtctctgt ctgactgtgt ttctgtattt gtctgaaaat atgggcccgg gctagcctgt 1020
taccactccc ttaagtttga ccttaggtca ctggaaagat gtcgagcggg tcgctcacia 1080

ES 2 819 451 T3

ccagtcggtg gatgtcaaga agagacgttg ggttaccttc tgctctgcag aatggccaac 1140
 ctttaacgtc ggatggccgc gagacggcac ctttaaccga gacctcatca cccaggttaa 1200
 gatcaaggtc ttttcacctg gcccgcatgg acaaccagac caggtcccct acatcgtgac 1260
 ctgggaagcc ttggcttttg acccccctcc ctgggtcaag ccctttgtac accetaagcc 1320
 tccgcctcct ctctctccat ccgccccgtc tctccccctt gaacctcctc gttcgacccc 1380
 gcctcgatcc tcctttatc cagccctcac tccttctcta ggcgccccca tatggccata 1440
 tgagatctta tatggggcac ccccgcccct tgtaaacttc cctgaccctg acatgacaag 1500
 agttactaac agcccctctc tccaagctca cttacaggct ctctacttag tccagcacga 1560
 agtctggaga cctctggcgg cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtaacctc 1620
 cccttaccga gtggcgaca cagtgtgggt ccgcccacac cagactaaga acctagaacc 1680
 tcgctggaaa ggacctaca cagtctctgt gaccaccccc accgcctca aagtagacgg 1740
 catcgacgct tggatacacg ccgcccacgt gaaggctgcc gacccccggg gtggaccatc 1800
 ctctagaccg ccatgtcggg ggcagggtgcc accggccgcg ccatggacgg gccgcgctg 1860
 ctgctgttgc tgcttctggg ggtgtccctt ggagggtgcca aggaggcatg cccacagggc 1920
 ctgtacacac acagcgtgga gtgctgcaaa gcctgcaacc tggcgagggg tgtggcccag 1980
 ccttgtggag ccaaccagac cgtgtgtgag ccctgcctgg acagcgtgac gttctccgac 2040
 gtgggtgagcg cgaccgagcc gtgcaagccg tgcaccgagt gcgtggggct ccagagcatg 2100
 tcggcgccat gcgtggaggg cgacgacgcc gtgtgccgct gcgcctacgg ctactaccag 2160
 gatgagacga ctggggcgtg cgaggcgtgc cgcgtgtgcg aggcgggctc gggcctcgtg 2220
 ttctcctgcc aggacaagca gaacaccgtg tgcgaggagt gcccgcacgg cacgtattcc 2280
 gacgagggca accacgtgga ccctgtcctg ccctgcaccg tgtcgcagga caccgagcgc 2340
 cagctccgcg agtgcacacg ctgggcccgc gccgagtgcg aggagatccc tggccgttgg 2400
 attacacggt ccacaccccc agagggctcg gacagcacag ccccagcac ccaggagcct 2460
 gaggcacctc cagaacaaga cctcatagcc agcacggtgg caggtgtggt gaccacagtg 2520
 atgggcagct cccagcccgt ggtgaccgga ggcaccaccg acaacctcat ccctgtctat 2580
 tgctccatcc tggctgctgt ggttgtgggt cttgtggcct acatagcctt caagaggtgg 2640
 aacagctccg gctccggagc caccaacttc agcctgctga agcaggccgg cgacgtggag 2700
 gagaaccccc gccccgcccg cgtatgggt gtccttaccg agctcctggg actgctcctg 2760
 ctgtggatca ccgacgccat ctgcgacatc cagatgaccc agagccctgc cagcctgtct 2820
 accagcctgg gcgagacagt gaccatccag tgtcaggcca gcgaggacat ctactctggc 2880
 ctggcttggg atcagcagaa gcccgcaag agccctcagc tgctgatcta cggcgcacgc 2940
 gacctgcagg acggcgtgcc tagcagattc agcggcagcg gctccggaac ccagtacagc 3000

ES 2 819 451 T3

ctgaagatca ccagcatgca gaccgaggac gagggcgtgt acttctgcca gcaaggcctg 3060
 acctacccta gaaccttcgg aggaggcacc aagctggaac tgaagggcgg aggcggaagt 3120
 ggagggcgag gatctggcgg cggaggctct gaagtgcagc tgcagcagtc tggcgctgaa 3180
 ctggtccggc ctggcactag cgtgaagctg tcctgcaagg tgtccggcga caccatcacc 3240
 ttctactaca tgcacttcgt gaagcagagg ccaggacagc gcctggaatg gatcggcaga 3300
 atcgaccctg aggacgagag caccaagtac agcgagaagt tcaagaacaa ggccaccctg 3360
 accgccgaca ccagcagcaa caccgcctac ctgaagctgt ctagcctgac ctccgaggac 3420
 accgccacct acttttgcct ctacggcggc tactacttcg actactgggg ccagggcgtg 3480
 atggtcacog tgtccagcat cgagttcatg taccctctc cctacctgga caacgagaga 3540
 agcaacggca ccatcatcca catcaaagaa aagcacctgt gccacacca gagcagcccc 3600
 aagctgttct gggccctggt ggtggtggcc ggcgtgctgt tctgttacgg cctgctggtc 3660
 acagtggccc tgtcgtgat ctggaccaac agcagaagaa acagagggcg ccagagcgac 3720
 tacatgaaca tgacccccag aaggccaggc ctgaccagaa agccctacca gccctacgcc 3780
 cctgccagag acttcgccgc ctacagaccg agagccaagt tcagcagatc cgccgagaca 3840
 gccccaacc tgcaggacc taaccagctg ttcaacgagc tgaacctggg cagacgggag 3900
 gaatttgacg tgctggaaaa gaagagagcc agggacccc agatggggcg caagcagcag 3960
 agaagaagaa accctcagga aggcgtctac aagccctgc agaaagacaa gatggccgag 4020
 gcctacagcg agatggcac caagggcgag agaagaagg gcaaggcca cgatggcctg 4080
 ttccagggcc tgtccaccgc caccaaggac accttcgacg ccctgcacat gcagaccctg 4140
 gccccagag gttctggcga gggtcggggg tctctgctga cctgcggtga tgtcgaggaa 4200
 aatccaggtc ccatgtaccg catgcaactt ttgtcctgta ttgctctgtc cctggccctc 4260
 gttaccaatt ctgattcccc agatagacca tggaaaccac caactttctc cccagctttg 4320
 ttggtcgtca ctgaaggtga taacgctact ttcacttgtt ccttctcaa cacttccgaa 4380
 tccttccatg ttgtttggca tcgtgaatcc ccatccggtc aaactgatac attggctgct 4440
 ttcccagaag atagatccca accaggtcaa gatgctagat tcagagttac tcaattgcca 4500
 aacggtagag atttcacat gtccgtcgtc agagctagaa gaaacgattc cgttacttat 4560
 gtttgtggtg ttatttcctt tgctccaaag attcaaatta aggaatcctt gagagctgaa 4620
 ttgagagtca ctgaaagaga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 4680
 ggcgagggtt ctagtggagg cggtagtggg ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 4740
 ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 4800
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 4860

ES 2 819 451 T3

tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 4920
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 4980
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aggatcatac 5040
ccatacgatg ttccagatta cgcttaatga ggatccgata aaataaaaga ttttatttag 5100
tctccagaaa aaggggggaa tgaaagacc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt 5160
aacgccattt tgcaaggcat ggaaaataca taactgagaa tagagaagt cagatcaagg 5220
ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct 5280
gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtcccgcct cagcagtttc 5340
tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacc tgtgccttat 5400
ttgaactaac caatcagttc gcttctcgt tctgttcgcg cgcttctgct ccccgagctc 5460
aataaaagag ccacacaacc ctcaactcggc gcgccagtcc tccgatagac tgcgtcgccc 5520
gggtaccogt gtatccaata aaccctcttg cagttgcata cgacttgtgg tctcgtggt 5580
ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccctcag cgggggtctt tcatgggtaa 5640
cagtttcttg aagttggaga acaacattct gagggtagga gtcgaatatt aagtaatcct 5700
gactcaatta gccactgttt tgaatccaca tactccaata ctctgaaat ccatacgtg 5760
agttcattat ggacagcgca gaaagagctg gggagaattg tgaaattgtt atccgctcac 5820
aattccacac aacatacagag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatagag 5880
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtc ttccagtcgg gaaacctgtc 5940
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 6000
ctcttccgct tcctcgtcga ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 6060
atcagctcac tcaaagcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 6120
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 6180
gtttttccat aggtcctcgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcaag 6240
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 6300
gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tccctcggg 6360
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 6420
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 6480
taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 6540
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt agcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg 6600
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 6660
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 6720
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaagatctc aagaagatcc 6780

ES 2 819 451 T3

ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggattht 6840
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagtht 6900
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctctgac agttaccaat gcttaatcag 6960
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt 7020
 cgtgtagata actacgatac gggagggtctt accatctggc cccagtgtcg caatgatacc 7080
 gcgagacca cgctcaccgg ctccagatth atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 7140
 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccc 7200
 ggaagctaga gtaagtagtt cgcagttaa tagtttgcc aacgttggtg ccattgctac 7260
 aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 7320
 atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 7380
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 7440
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 7500
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgc ccgctcaat 7560
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagt ctcacattg gaaaacgttc 7620
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 7680
 tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 7740
 aacaggaagg caaatgccc caaaaaagg aataaggcg acacggaat gttgaatact 7800
 catactctc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 7860
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaatagg gttccgcgca catttccccg 7920
 aaaagtcca cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag 7980
 gcgtatcac aggcccttc gtctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca 8040
 catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc 8100
 ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc 8160
 agagcagatt gtactgagag tgcacatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 8220
 gagaaaatac cgcatcaggc gccattcgc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg 8280
 atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaag ggggatgtg ctgcaagcgg 8340
 attaagttgg gtaacgccag ggttttcca gtcacgacgt tgtaaacga cggccagtgc 8400
 cagctctcc cttatgcgac tcctgcatta ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt 8460
 tgagcaccgc ccccgaagg aatggtgcat gcaaggagat ggcgcccaac agtcccccg 8520
 ccacggggcc tgccaccata cccacgccga aacaagcgt catgagcccg aagtggcgag 8580
 cccgatctc cccatcgggt atgtcggcga tataggcgc agcaaccgca cctgtggcgc 8640

ES 2 819 451 T3

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cggatgatgcc | ggccacgatg | cgtccggcgt | agagggcatt | taaagacagg | atatcagtgg | 8700 |
| tccaggctct | agttttgact | caacaatata | accagctgaa | gcctatagag | tacgagccat | 8760 |
| agataaaata | aaagatttta | tttagtctcc | agaaaaagg | gggaa | | 8805 |

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de muerte celular programada de alta afinidad 1 (PD-1), donde el polipéptido es una variante de la secuencia de PD-1 natural humano que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de al menos 85 % de identidad con el mismo, donde el polipéptido PD-1 de alta afinidad:

- (a) carece de un dominio transmembrana PD-1, y
 (b) comprende una o más sustituciones de aminoácidos, donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido PD-1 de alta afinidad por el ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1) en comparación con la afinidad por PD-L1 del polipéptido PD-1 natural humano,

y donde la una o más sustituciones de aminoácidos se encuentra en una posición de aminoácidos seleccionada de entre: V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106, y A107 de SEQ ID NO: 2.

2. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1, donde el polipéptido PD-1 tiene una K_d de 1×10^{-7} M o menos para PD-L1.

3. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la una o más sustituciones de aminoácidos se encuentra en una posición de aminoácidos de PD-1 que contacta con PD-L1.

4. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el polipéptido PD-1 de alta afinidad comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2-25.

5. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre: (1) V39H o V39R; (2) L40V o L40I; (3) N41I o N41V; (4) Y43F o Y43H; (5) R44Y o R44L; (6) M45Q, M45E, M45L, o M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V; (8) N49C, N49G, N49Y, o N49S; (9) Q50K, Q50E, o Q50H; (10) T51V, T51L, o T51A; (11) D52F, D52R, D52Y, o D52V; (12) K53T o K53L; (13) A56S o A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V; (16) Q66P; (17) V72I; (18) H82Q; (19) M83L o M83F; (20) R90K; (21) Y96F; (22) L97Y, L97V, o L97I; (23) A100I o A100V; (24) S102T o S102A; (25) L103I, L103Y, o L103F; (26) A104S, A104H, o A104D; (27) P105A; (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T; y (29) A107P, A107I, o A107V.

6. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende sustituciones de aminoácidos ubicadas en posiciones de aminoácidos seleccionadas de entre:

- (a) V39, N41, Y43, M45, S48, N49, Q50, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106, y A107;
 (b) V39, N41, Y43, M45, S48, Q50, T51, D52F, K53, A56, Q63, G65, Q66, L97, S102, L103, A104, K106, y A107;
 (c) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, M83, L97, A100, y A107;
 (d) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66, M83, L97, y A107;
 (e) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, Q66, H82, M83, L97, A100, y A107;
 (f) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, M83, L97, A100, y A107;
 (g) V39, L40, N41, Y43, R44, M45, N49, K53, L97, A100, y A107; y
 (h) V39, L40, N41, Y43, M45, N49, K53, L97, A100, y A107.

7. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre:

- (a) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V};
 (b) {V39H o V39R}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {S48D, S48L, S48N, S48G, o S48V}, {Q50K, Q50E, o Q50H}, {T51V, T51L, o T51A}, {D52F, D52R, D52Y, o D52V}, {K53T o K53L}, {A56S o A56L}, {Q63T, Q63I, Q63E, Q63L, o Q63P}, {G65N, G65R, G65I, G65L, G65F, o G65V}, {Q66P}, {L97Y, L97V, o L97I}, {S102T o S102A}, {L103I, L103Y, o L103F}, {A104S, A104H, o A104D}, {K106G, K106E, K106I, K106V, K106R, o K106T}, y {A107P, A107I, o A107V};
 (c) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D},

- {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V};
- (d) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, y {A107P, A107I, o A107V};
- 5 (e) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {Q66P}, {H82Q}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V};
- (f) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {M83L o M83F}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V};
- 10 (g) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {R44Y o R44L}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V};
- y
- (h) {V39H o V39R}, {L40V o L40I}, {N41I o N41V}, {Y43F o Y43H}, {M45Q, M45E, M45L, o M45D}, {N49C, N49G, N49Y, o N49S}, {K53T o K53L}, {L97Y, L97V, o L97I}, {A100I o A100V}, y {A107P, A107I, o A107V}.
- 15
8. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre:
- (a) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48G, N49Y, Q50E, K53T, A56S, Q63T, G65L, Q66P, L97V, S102A, L103F, A104H, K106V, y A107I;
- 20 (b) V39R, N41V, Y43H, M45E, S48N, Q50H, T51A, D52Y, K53T, A56L, Q63L, G65F, Q66P, L97I, S102T, L103F, A104D, K106R, y A107I;
- (c) V39H, L40V, N41V, Y43H, R44Y, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100I, y A107I;
- (d) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, Q66P, M83L, L97V, y A107I;
- 25 (e) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49S, K53T, Q66P, H82Q, M83L, L97V, A100V, y A107I;
- (f) V39H, L40I, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, M83L, L97V, A100V, y A107I;
- (g) V39H, L40V, N41I, Y43H, R44L, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I;
- (h) V39H, L40V, N41I, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I; y
- (i) V39H, L40V, N41V, Y43H, M45E, N49G, K53T, L97V, A100V, y A107I.
- 30
9. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido PD-1 de alta afinidad comprende un compañero de fusión.
10. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 9, donde el compañero de fusión es un fragmento de una secuencia de polipéptido de inmunoglobulina humana, donde el fragmento se selecciona de entre: (a) un dominio CH3; y (b) parte o la totalidad de una región Fc.
- 35
11. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 9, donde el compañero de fusión se selecciona de entre: un dominio de multimerización; una citocina; una citocina atenuada; un agonista de 41BB; agonista de CD40; un inhibidor de BTLA y/o CD160; y un inhibidor de TIM3 y/o CEACAM1.
- 40
12. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una o más sustituciones seleccionadas de entre: R87C, N91C y R122C.
- 45
13. El polipéptido PD-1 de alta afinidad según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 3-25 y 39-46.
- 50
14. El polipéptido PD-1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, para uso en la prevención o tratamiento de cáncer, infección o enfermedad o trastorno inmunológico.

Fig. 1A

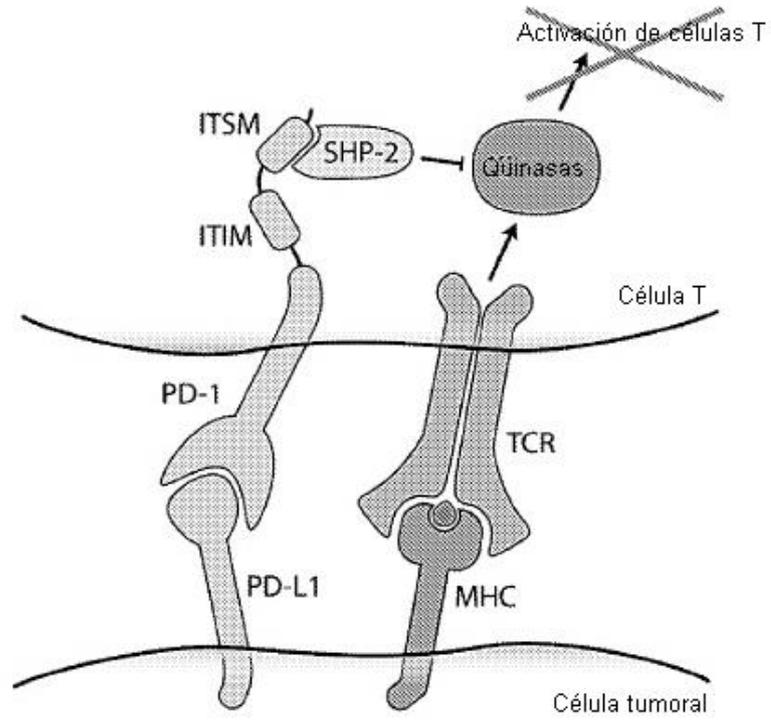


Fig. 1B

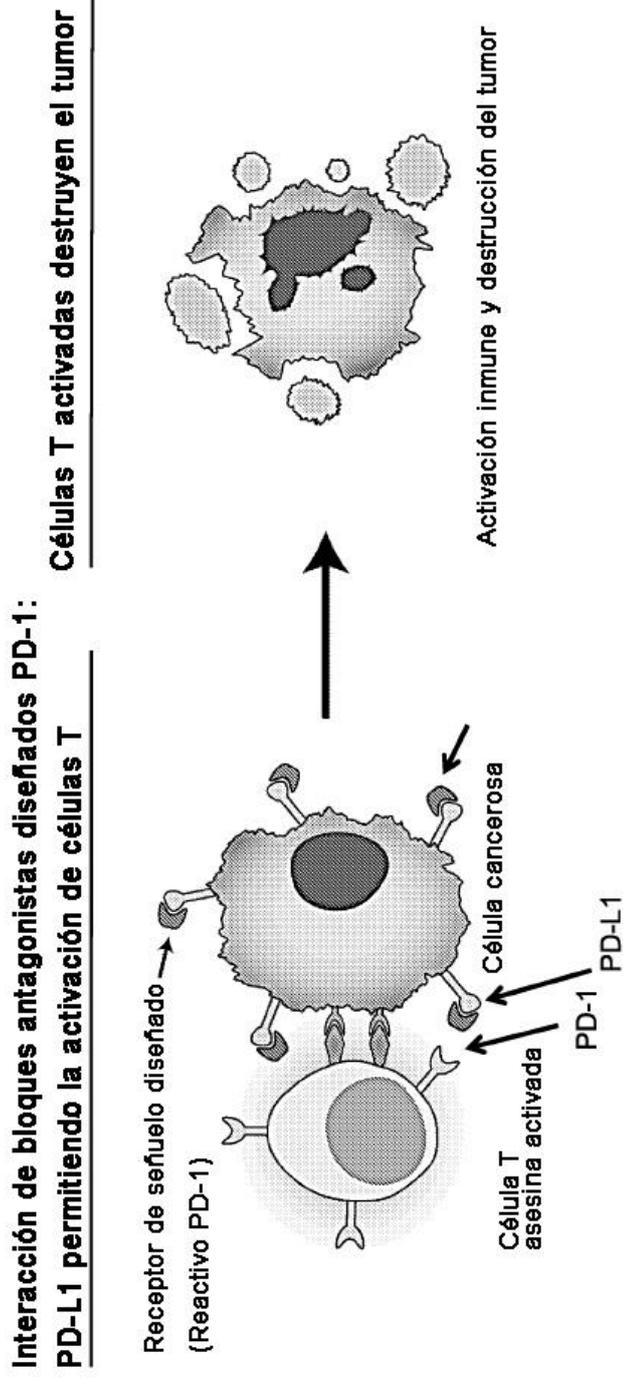


Fig. 2A

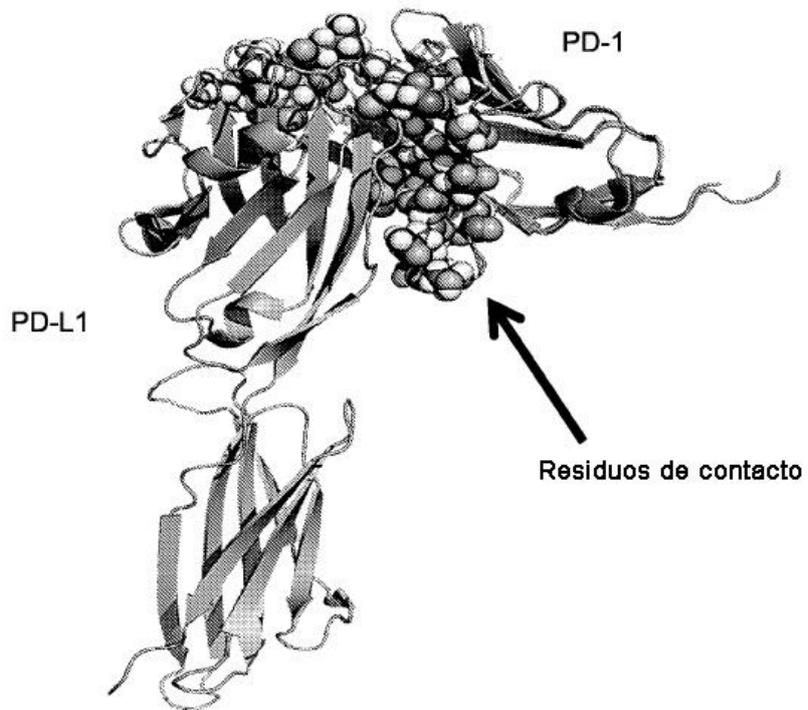


Fig. 2B

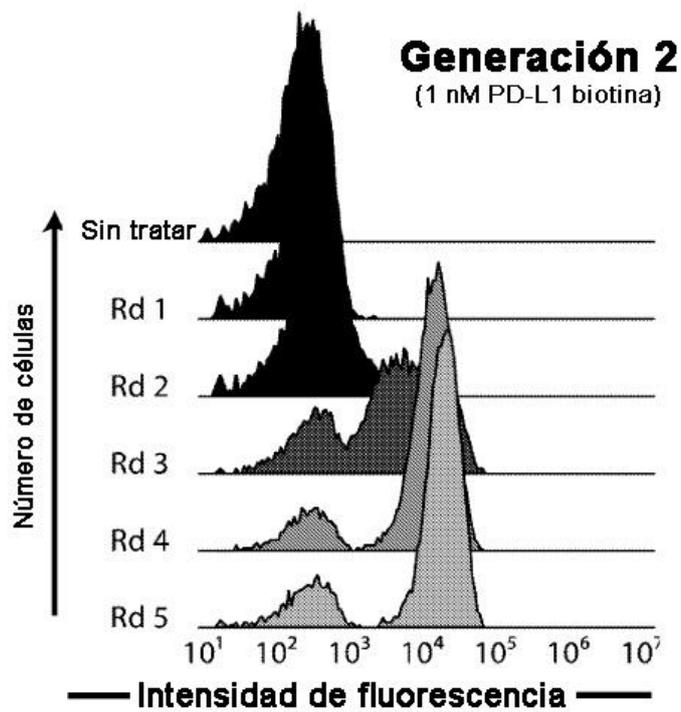
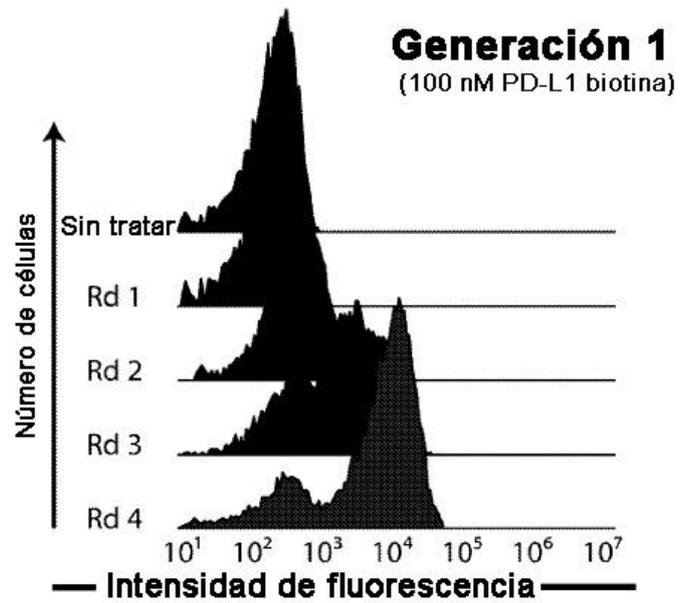


Fig. 3

| SEQ ID NO | A.A. Posición | 39 | 40 | 41 | 43 | 44 | 45 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 55 | 56 | 60 | 63 | 65 | 66 | 72 | 82 | 83 | 90 | 96 | 97 | 100 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 111 | PD-L1 afinidad |
|-----------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|--------|--------------|----------------|
| 2 | hPD-1 | V | L | N | Y | R | M | S | N | Q | T | D | K | A | D | Q | G | Q | V | H | M | R | Y | L | A | S | L | A | P | K | A | E | 3.88 μ M | |
| 10 | G14-12 | H | | | | | Q | D | C | K | V | F | T | N | P | | | | | | | | Y | | | T | I | S | G | P | | | | |
| 11 | G14-2 | H | I | F | Q | L | G | L | F | I | R | | | | | | | | | | | | V | | | Y | S | E | I | | | | | |
| 12 | G14-5 | H | V | F | Q | N | G | V | R | E | I | P | | | | | | | | | | | V | | | Y | A | I | V | | | | | |
| 13 | G14-1 | R | V | H | E | G | Y | E | T | S | T | L | P | | | | | | | | | | V | | A | F | H | V | I | | 7.78 nM | | | |
| 14 | G14-4 | R | V | H | E | N | H | A | Y | T | L | L | F | P | | | | | | | | | I | | T | F | D | R | I | | 10.7 nM | | | |
| 15 | G14-10 | H | V | H | L | V | Y | V | L | P | V | | | | | | | | | | | | | | Y | D | T | I | | | | | | |
| 9 | G24-12 | H | V | V | H | Y | E | G | T | | | | | | | | | | | L | | | V | | | | | | | | | 218 pM | | |
| 5 | G24-1 | H | V | V | H | E | G | T | | | | | | | P | | | | | L | | | V | | | | | | | | | 267 pM | | |
| 8 | G24-5 | H | V | V | H | E | S | T | | | | | | | P | | | | Q | | | | V | | | | | | | | | 196 pM | | |
| 16 | G24-10 | H | V | V | H | Y | D | G | T | | | | | | P | I | | | | | | | I | | | | | | | | | | | |
| 17 | G24-14 | H | V | V | H | Y | E | G | T | | | | | | P | | | | | | | | | I | | | | | | | | | | |
| 18 | G24-4 | H | I | I | H | E | C | T | | | | | | | | | | | | I | | | F | V | V | | | | | | | | | |
| 19 | G24-22 | H | I | I | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | I | | | F | V | V | | | | | | | | | |
| 20 | G24-6 | R | V | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | | I | | | F | V | V | | | | | | | | | |
| 21 | G24-7 | H | V | V | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | I | L | | F | V | V | | F | | | | | | | |
| 22 | G24-18 | H | V | I | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | I | | | K | | V | | | | | | | | | |
| 6 | G24-2 | H | I | I | H | E | G | T | | | | | | | P | I | | | | L | | | V | | | | | | | | | | 222 pM | |
| 23 | G24-23 | H | I | I | H | E | G | T | | | | | | | P | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | |
| 7 | G24-3 | H | V | I | H | L | E | G | T | | | | | | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | 101 pM |
| 3 | Consenso 1 (HAC-I) | H | V | I | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | | | | V | V | | | | | | | | | 107 pM | |
| 4 | Consenso 2 (HAC-V) | H | V | V | H | E | G | T | | | | | | | | | | | | | | | V | V | | | | | | | | | | 110 pM |

Fig. 4

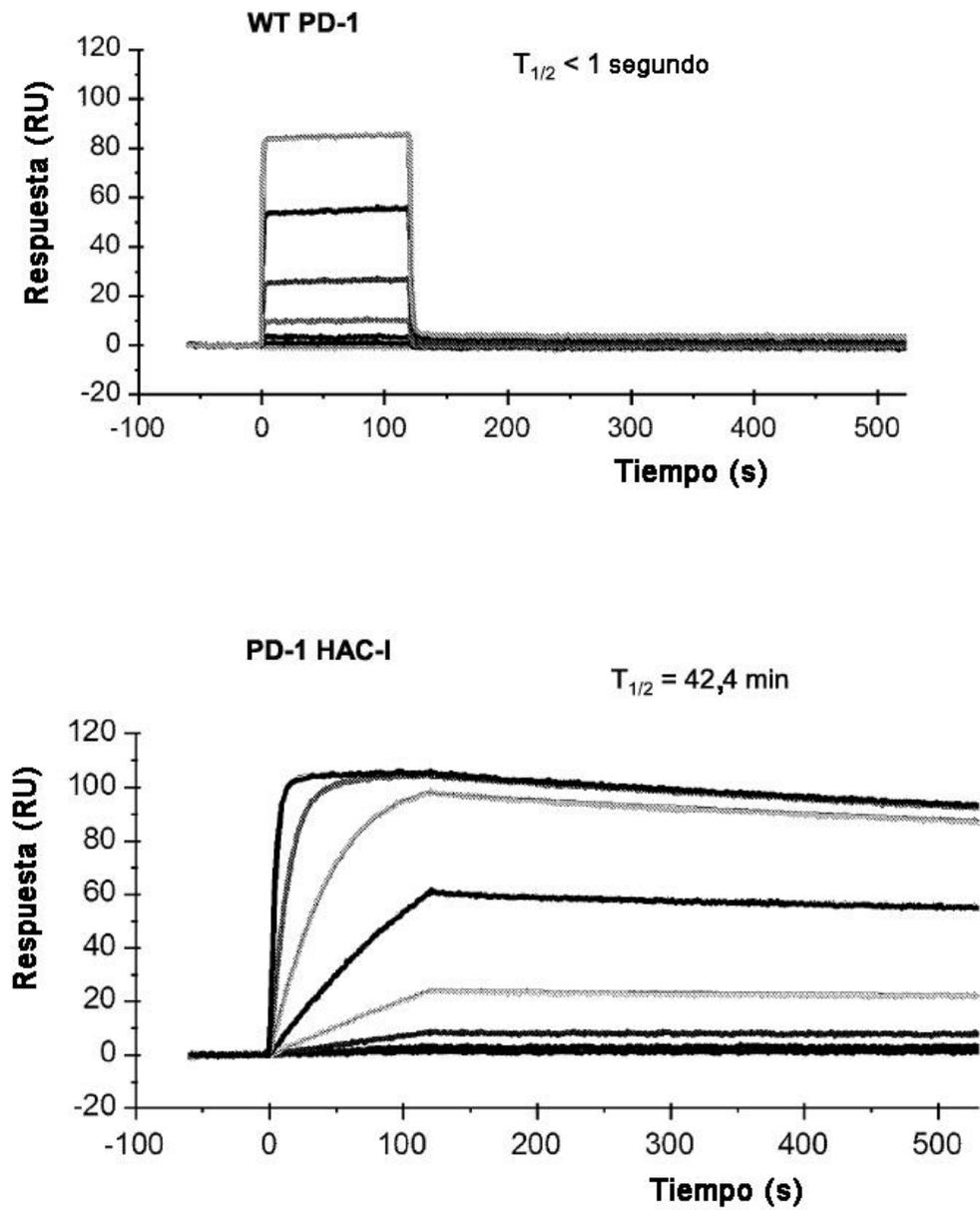


Fig. 5A

Bloqueo de tetrámero PD-1 en levadura PD-L1 humana

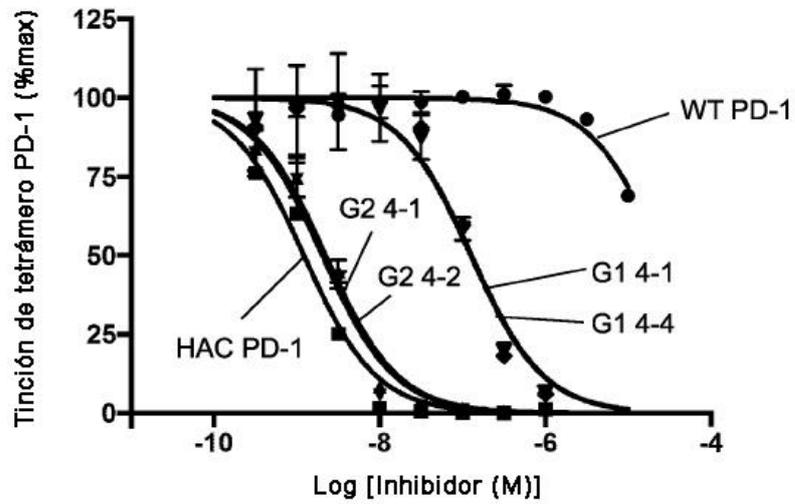


Fig. 5B

Bloqueo de tetrámero PD-1 en levadura PD-L2 humana

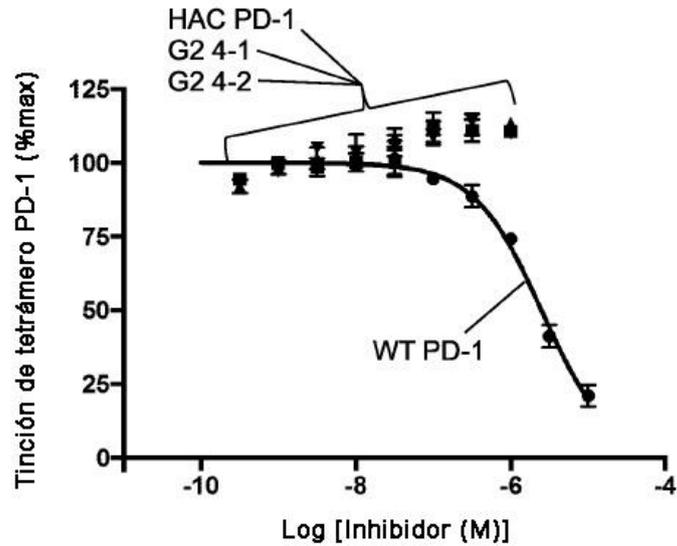


Fig. 5C

Bloqueo de tetrámero PD-1 en levadura PD-L1 murina

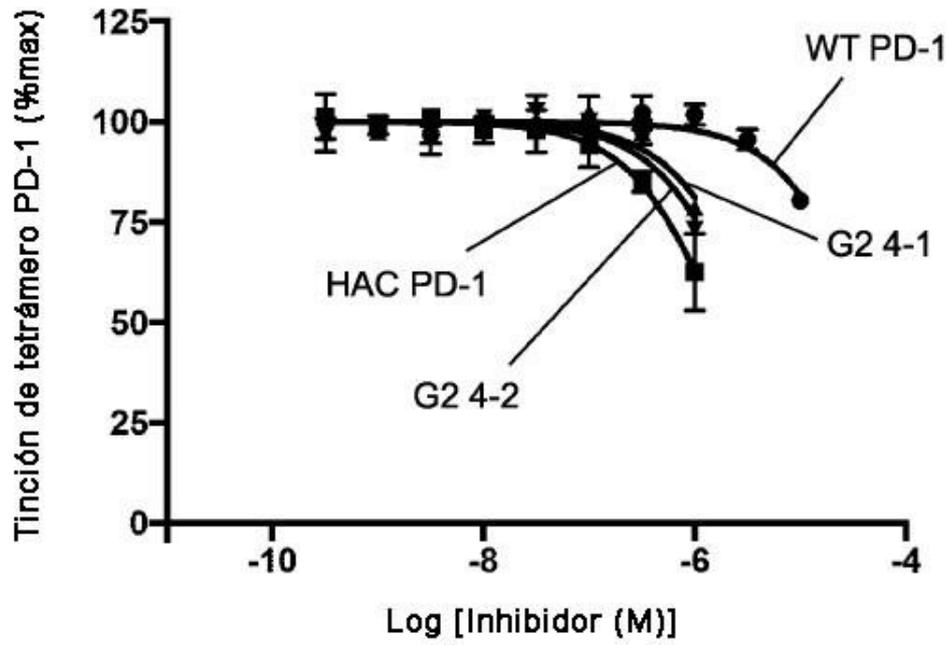


Fig. 6A

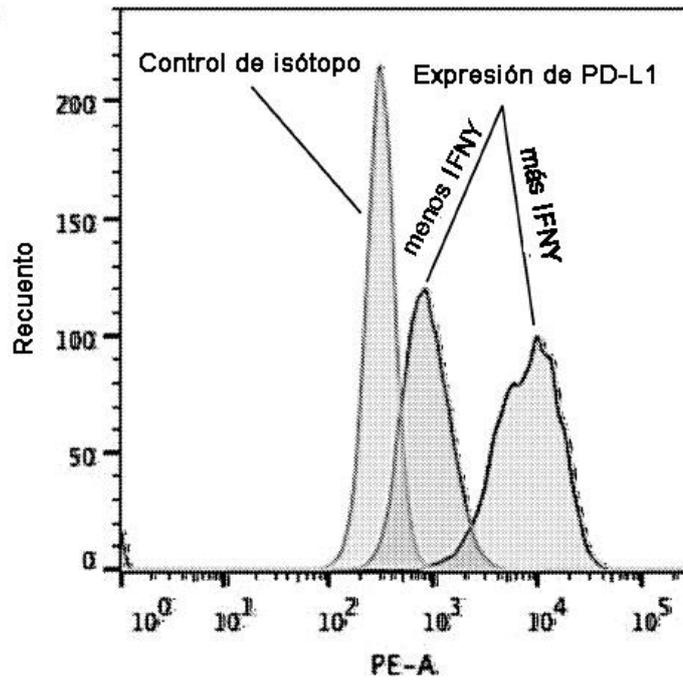
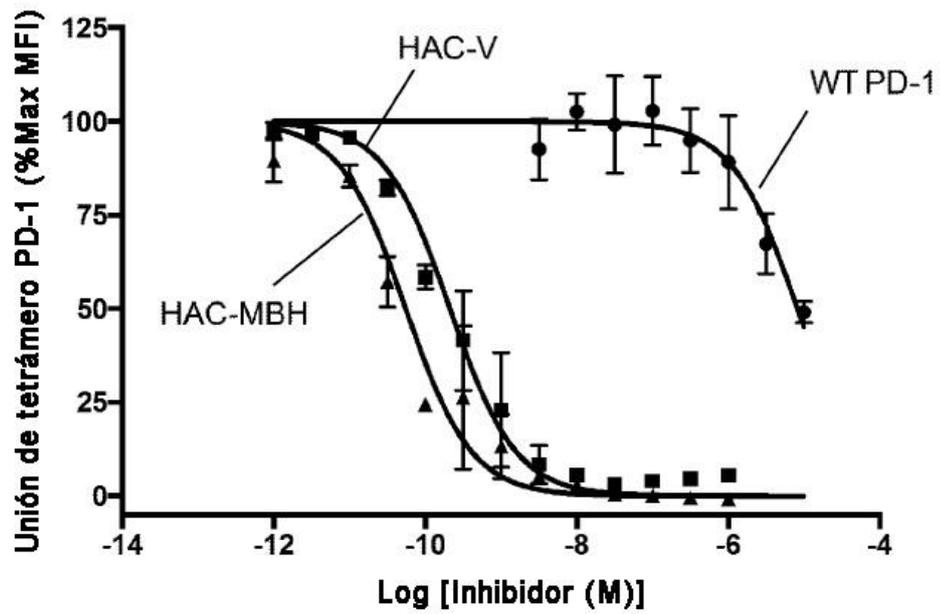


Fig. 6B



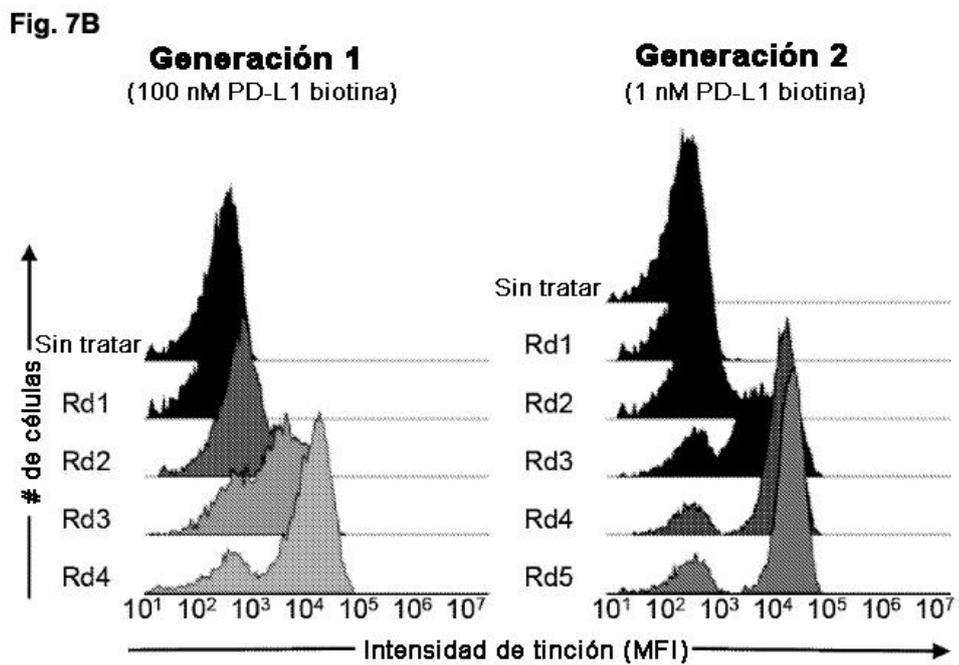
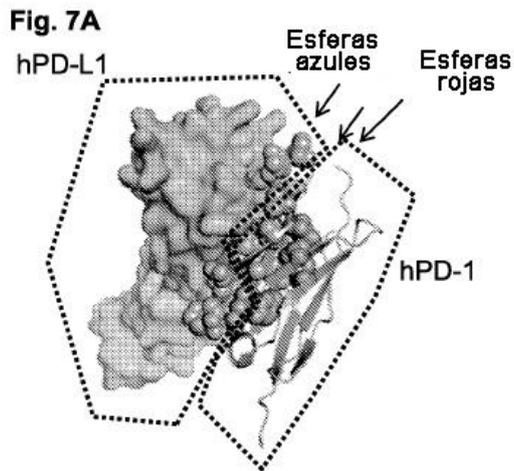


Fig. 7C

| Residuo# | Sitios de consenso de contacto | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Afinidad PD-L1 | | | |
|--------------------|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|---------|--------------|
| | 39 | 40 | 41 | 43 | 44 | 45 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 56 | 60 | 63 | 65 | 66 | 72 | 82 | 83 | 90 | 96 | 97 | 100 | 102 | 103 | 104 | 105 | | 106 | 107 | 111 |
| hPD-1 | V | L | N | Y | R | M | S | N | Q | T | D | K | A | D | Q | G | Q | V | H | M | R | Y | L | A | S | L | A | P | K | A | E | 3.88 μ M |
| G14-12 | H | | | | | Q | D | C | K | V | F | | | T | N | P | | | | | | Y | | T | I | S | G | P | | | | |
| G14-2 | H | | I | F | Q | L | G | L | G | V | R | | | E | I | P | | | | | | V | | V | Y | Y | S | E | I | | | |
| G14-5 | H | | V | F | Q | N | G | V | R | | | | | E | I | P | | | | | | V | | V | Y | Y | A | I | V | | | |
| G14-1 | R | | V | H | E | G | Y | E | | T | S | | | T | L | P | | | | | | V | | V | A | F | H | V | I | | 7.78 nM | |
| G14-4 | R | | V | H | E | N | E | N | H | A | Y | T | L | L | F | P | | | | | | I | | T | F | F | D | R | I | | 10.7 nM | |
| G14-10 | H | | V | H | L | V | Y | | | V | L | | | P | V | | | | | | | | | Y | D | T | | | | | | |
| G24-12 | H | | V | V | H | Y | E | G | | T | | | | | | | | L | | | | V | I | | | | | | | | 218 pM | |
| G24-1 | H | | V | V | H | E | G | | | T | | | | P | | | | L | | | | V | V | | | | | | | | 267 pM | |
| G24-5 | H | | V | V | H | E | S | | | T | | | | P | | | Q | | | | V | V | | | | | | | | | 196 pM | |
| G24-10 | H | | V | V | H | Y | D | G | | T | | | | P | | | I | | | | | V | V | | | | | | | | | |
| G24-14 | H | | V | V | H | Y | E | G | | T | | | | P | | | | | | | | V | V | | | | | | | | | |
| G24-4 | H | | I | I | H | E | C | G | | T | | | | | | | | | | | | F | V | V | | | | | | | | |
| G24-22 | H | | I | I | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | F | V | V | | | | | | | | |
| G24-6 | R | | V | V | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | F | V | V | | | | | | | | |
| G24-7 | H | | V | V | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | F | V | V | | F | | | | | | |
| G24-18 | H | | V | V | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | F | V | V | | | | | | | | |
| G24-2 | H | | I | I | H | E | G | | | T | | | | P | | | | | | | | V | V | | | | | | | | 222 pM | |
| G24-23 | H | | I | I | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | V | V | | | | | | | | | |
| G24-3 | H | | V | I | H | L | E | G | | T | | | | P | | | | | | | | V | V | | | | | | | | 101 pM | |
| Consenso 1 (HAC-I) | H | | V | I | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | V | V | | | | | | | | 107 pM | |
| Consenso 2 (HAC-V) | H | | V | V | H | E | G | | | T | | | | | | | | | | | | V | V | | | | | | | | 110 pM | |

Sitios de consenso principal

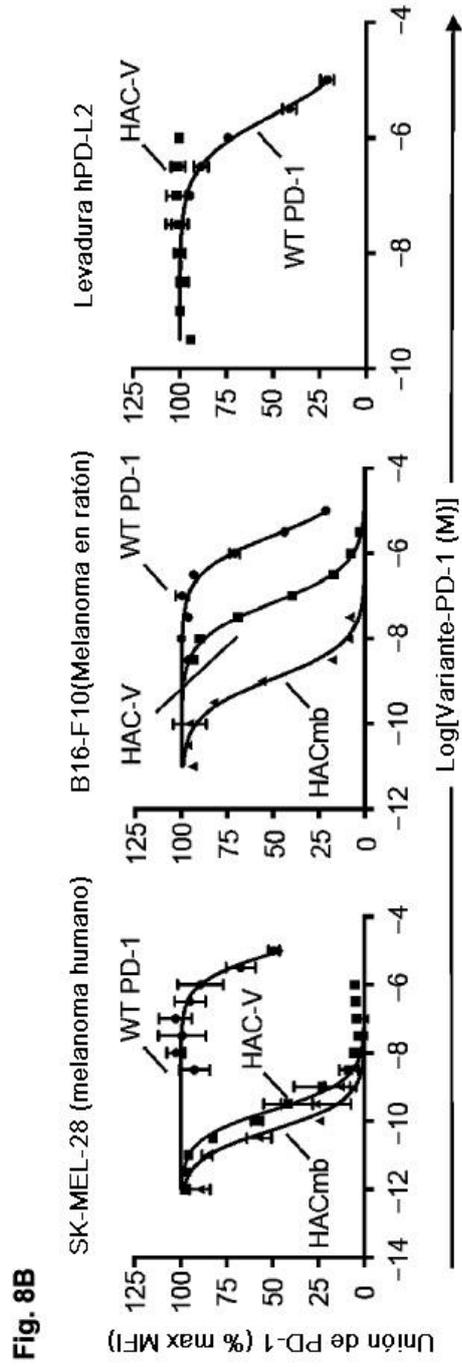
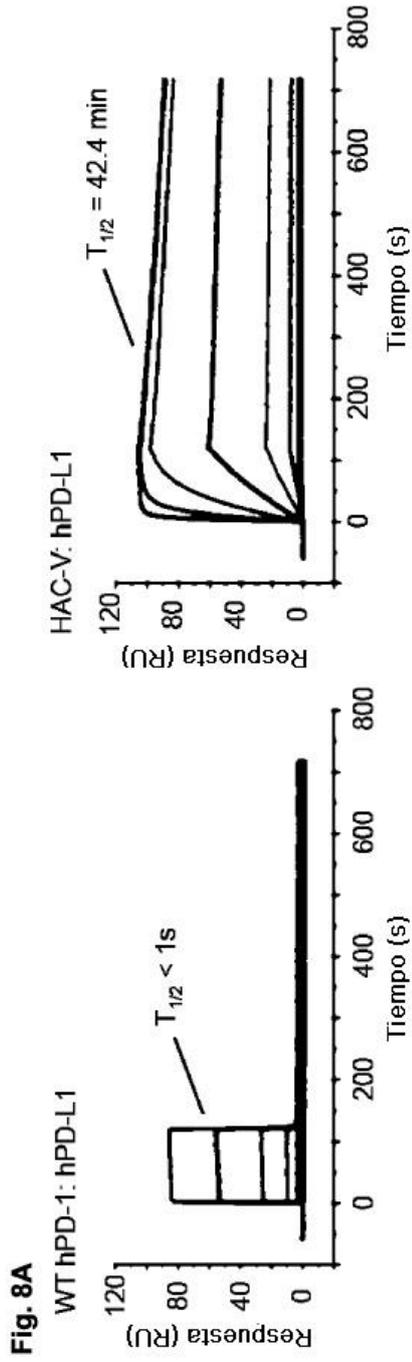
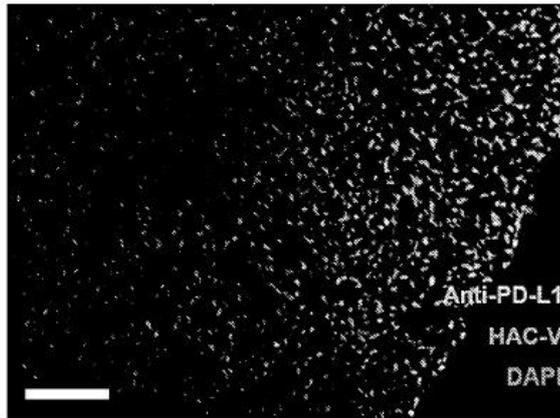
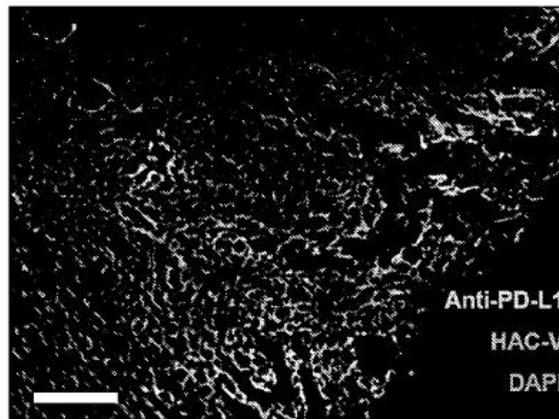


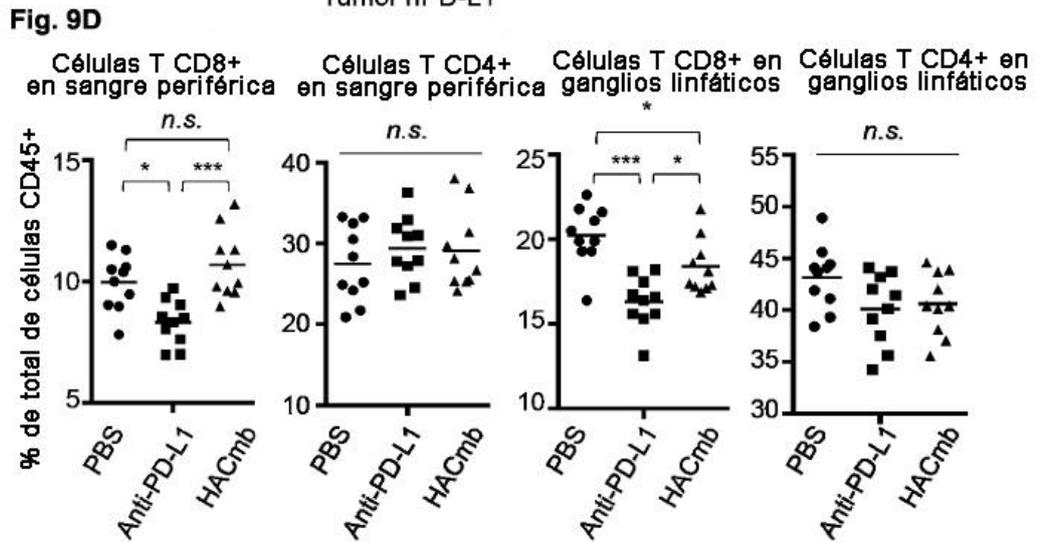
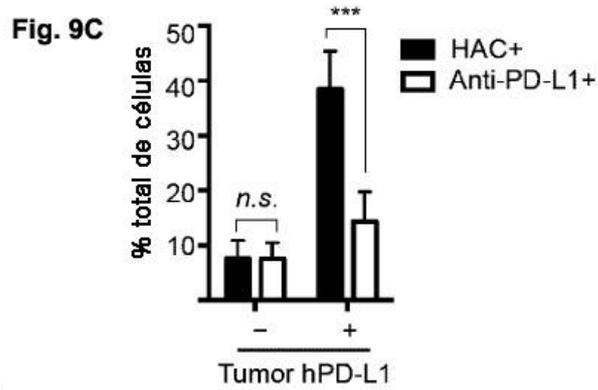
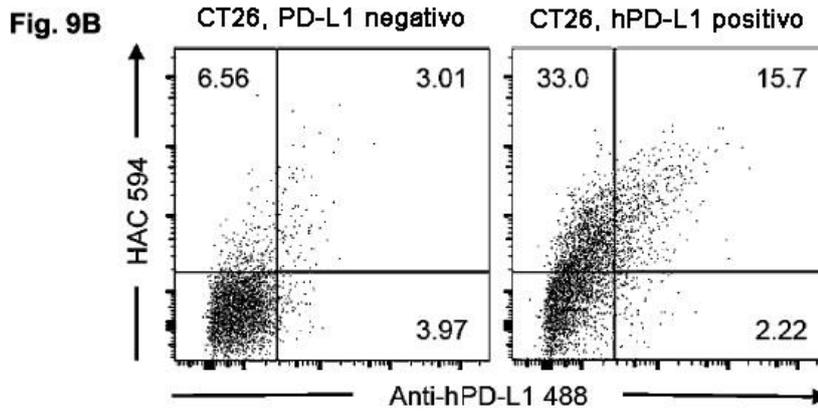
Fig. 9A

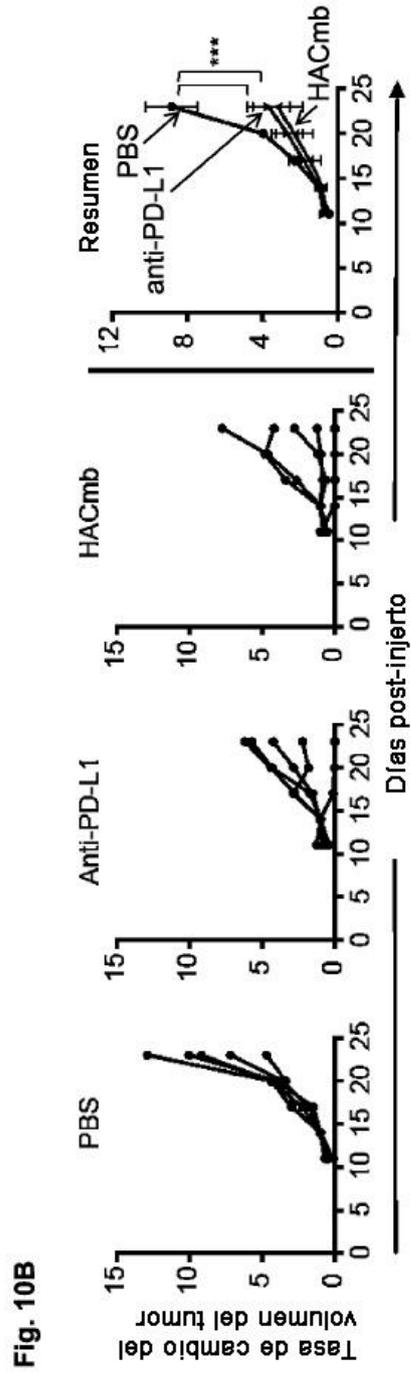
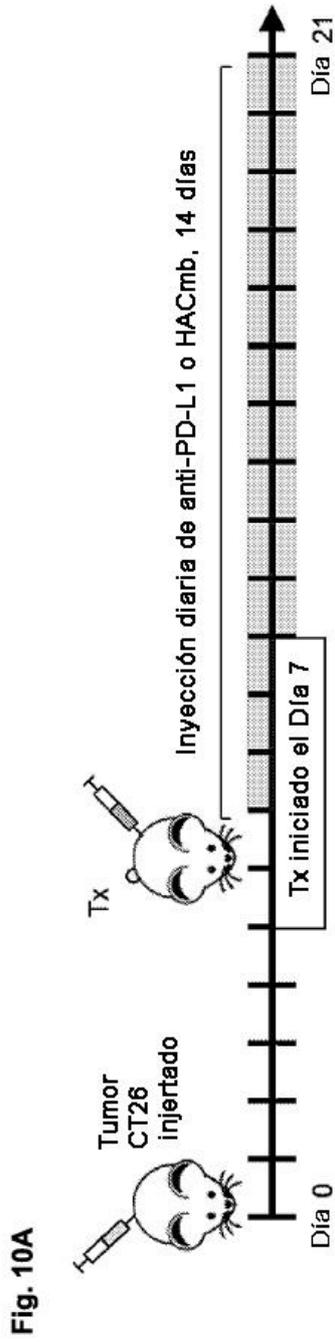
CT26, PD-L1 tumor negativo

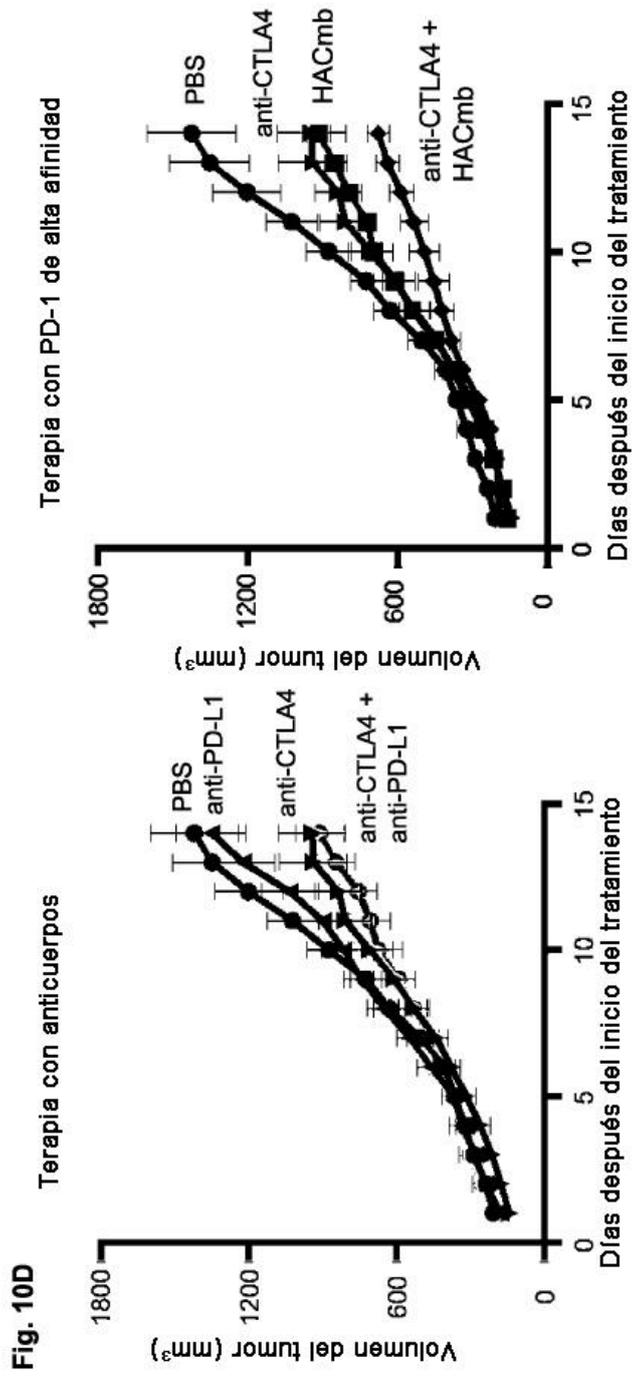
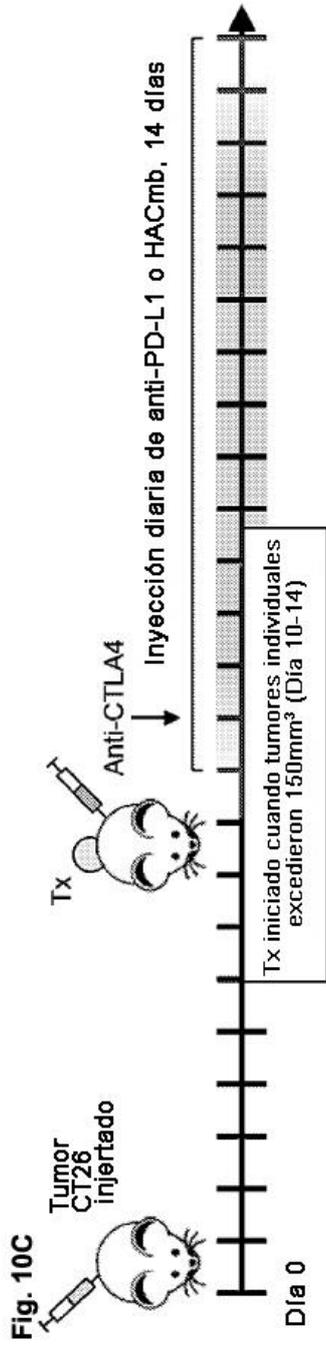


CT26, PD-L1 tumor positivo









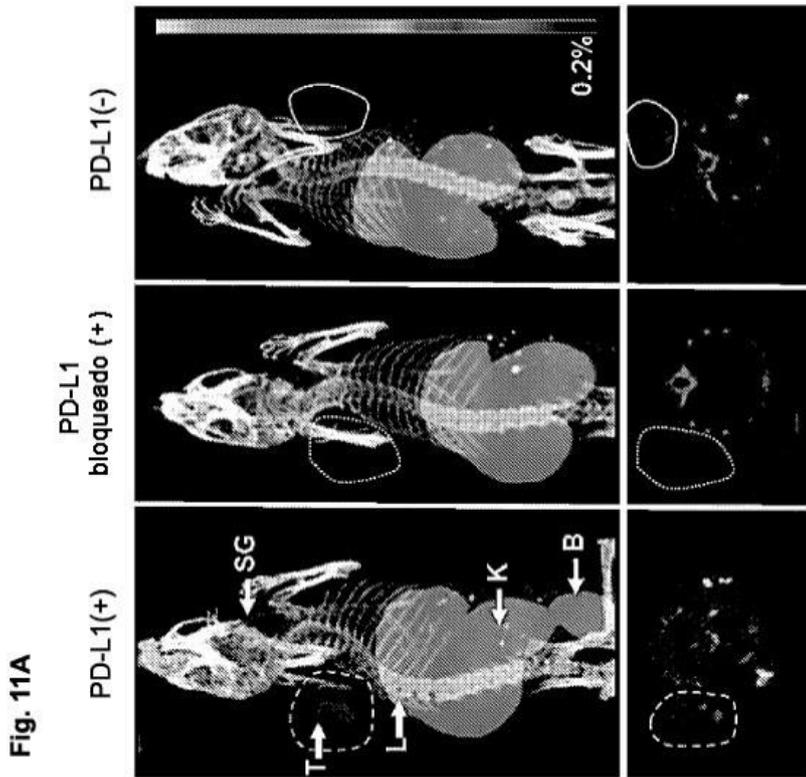
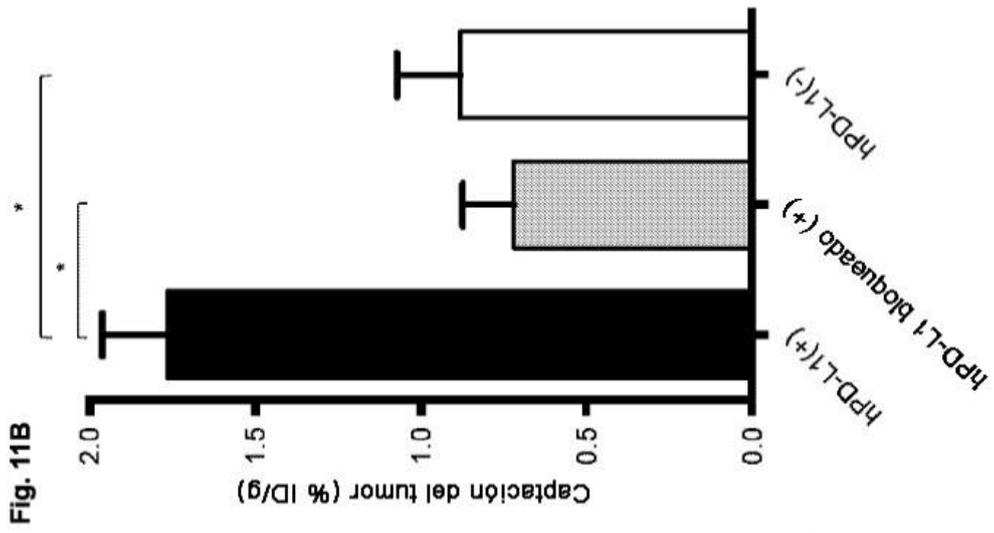


Fig. 12A

| Posición | Codón | Posibles residuos |
|----------|-------|-------------------|
| V39 | NDT | CDFGHILNRSVY |
| N41 | RWT | NIVD |
| Y43 | HWT | FYLHIN |
| M45 | VWG | EKLMQV |
| S48 | VNT | ADGHILNPRSTV |
| N49 | NDT | CDFGHILNRSVY |
| Q50 | VWW | HQNKDELIV |
| T51 | VYT | AILPTV |
| D52 | NDT | CDFGHILNRSVY |
| K53 | VNA | AEGIKLPQTVR |
| A56 | NHT | ADFHILNPSTVY |
| Q63 | VNA | AEGIKLPQTVR |
| G65 | NDT | CDFGHILNRSVY |
| Q66 | CMA | QP |
| L97 | NWT | FILVYHND |
| S102 | NCT | STAP |
| L103 | NDT | CDFGHILNRSVY |
| A104 | NHT | ADFHILNPSTVY |
| P105 | SCT | AP |
| K106 | VNA | AEGIKLPQTVR |
| A107 | NYT | FILVSPTA |
| E111 | VRW | DEHKNQSGR |

Fig. 12B

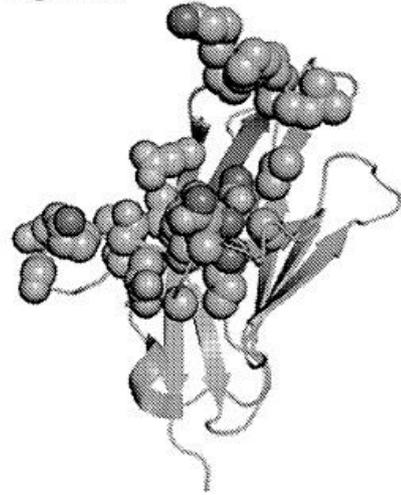


Fig. 13A

| Posición | Codón | Posibles residuos |
|----------|-------|-------------------|
| V39 | VRT | DGHNRS |
| L40 | NTT | FILV |
| N41 | NWT | FILVDHNY |
| Y43 | YWT | FHLY |
| R44 | YDT | FHLRYC |
| M45 | SAW | DEHQ |
| N49 | DRT | CDGNSY |
| K53 | AMA | KT |
| Q66 | CMA | QP |
| V72 | RYT | VAIT |
| M83 | NTS | FILVM |
| Y96 | YWT | FHLY |
| L97 | NTT | FILV |
| A100 | RYT | VAIT |
| L103 | YWT | FHLY |
| A107 | NTT | FILV |

Fig. 13B

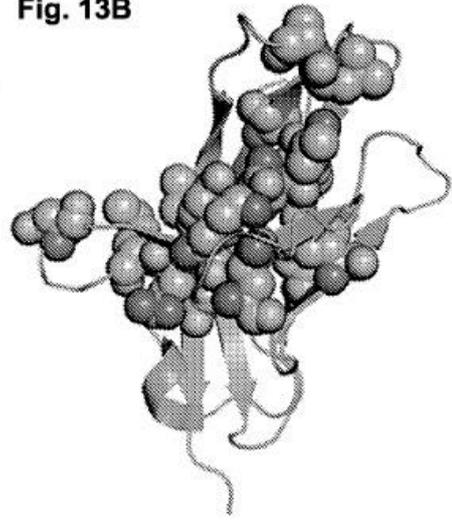


Fig. 14

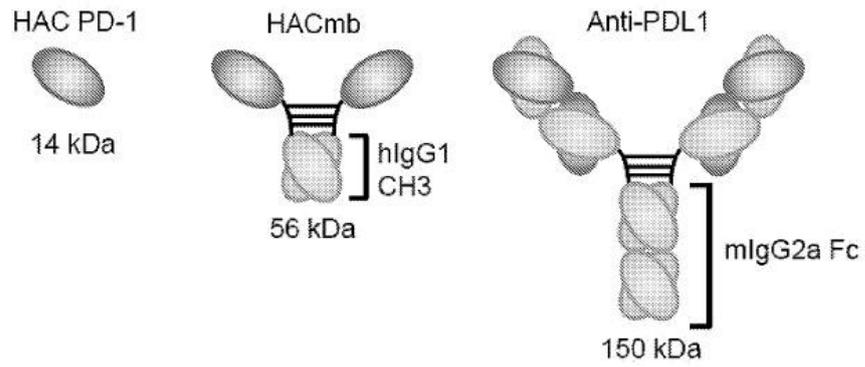


Fig. 15A

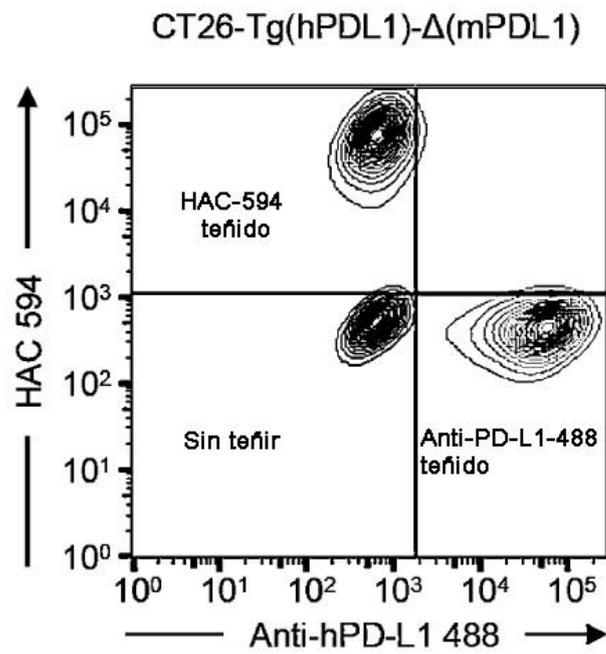


Fig. 15B

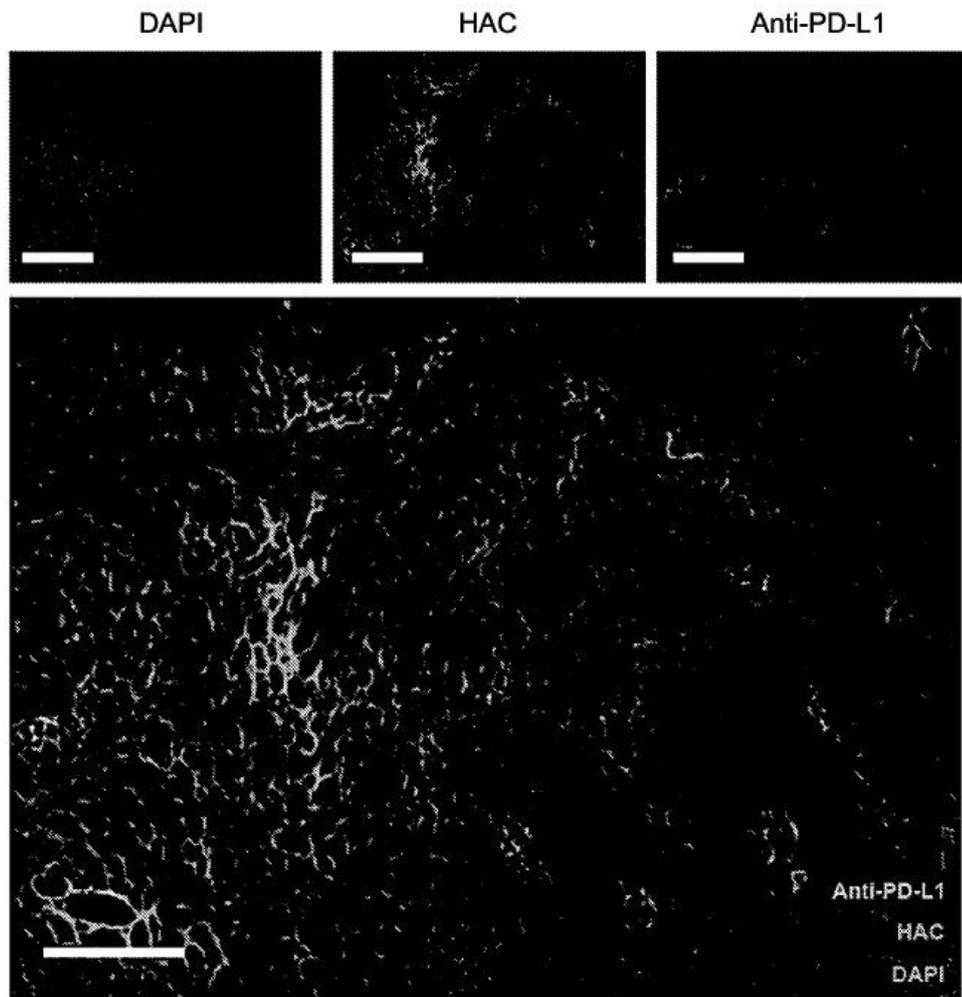


Fig. 16

Células T en sangre periférica,
Ratón Balb/c con CT26 injertado

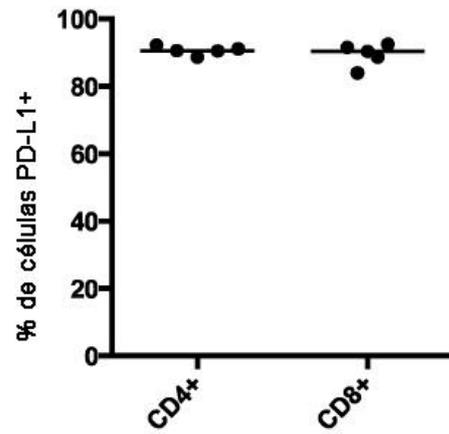


Fig. 17A

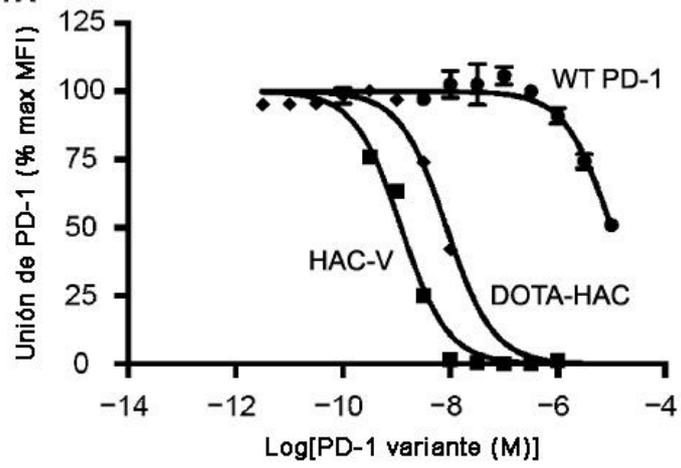


Fig. 17B

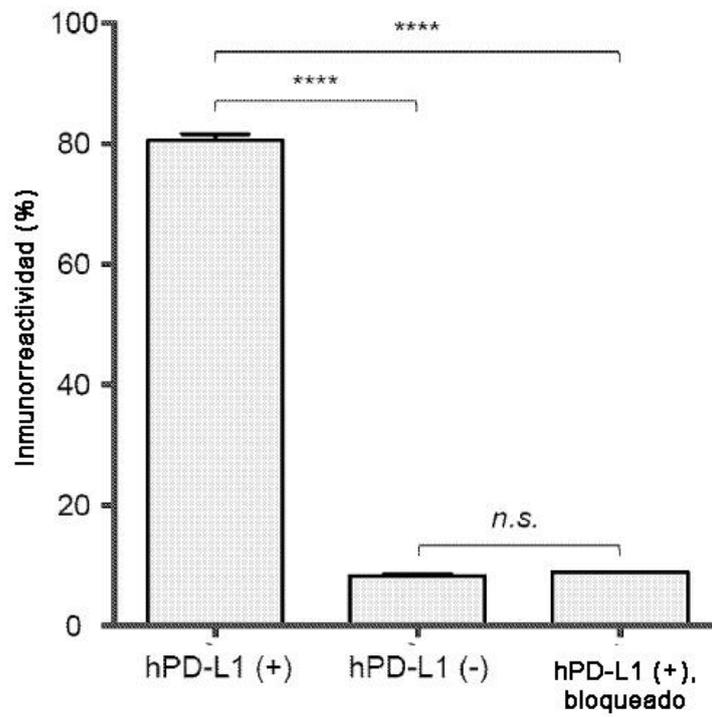


Fig. 18A

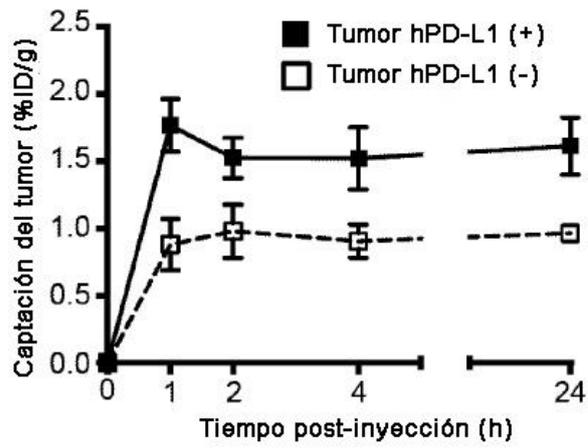


Fig. 18B

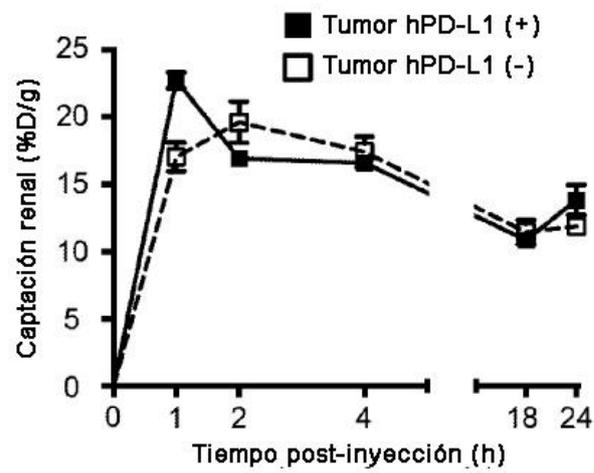


Fig. 18C

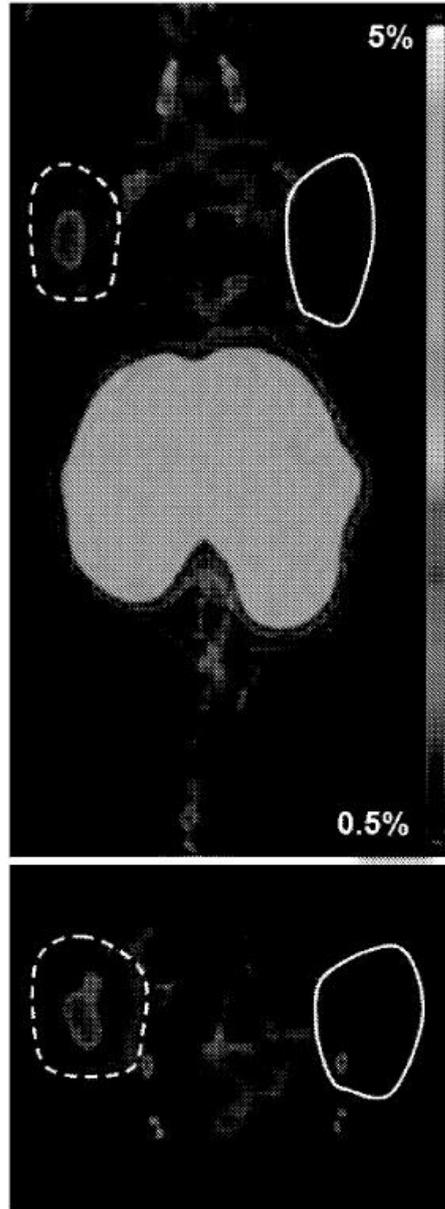


Fig. 18D

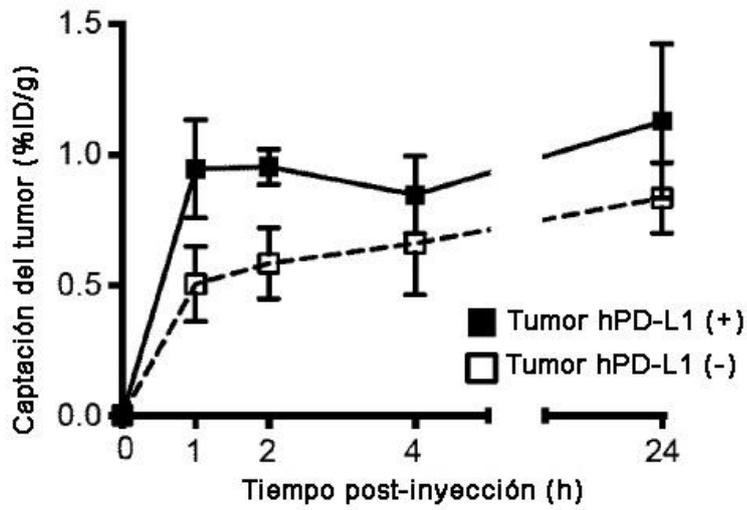
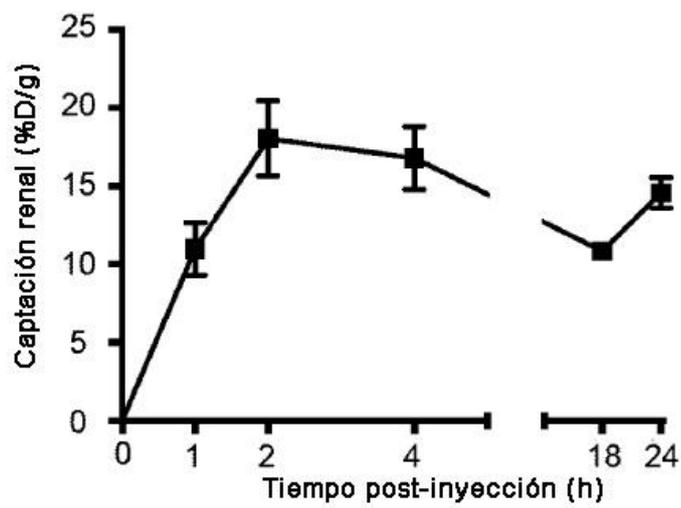


Fig. 18E



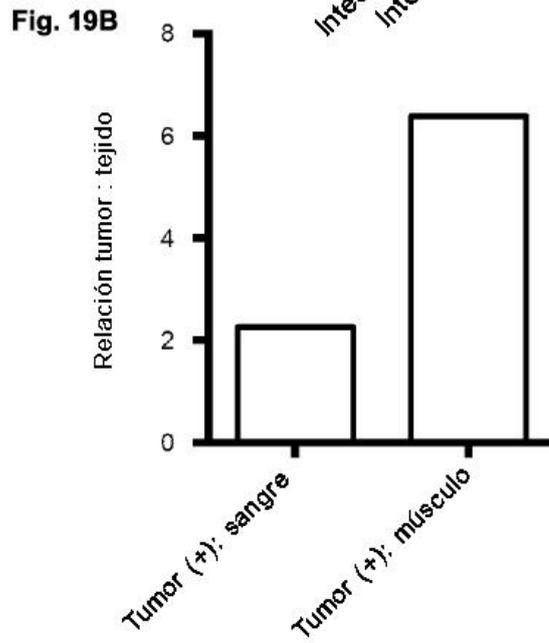
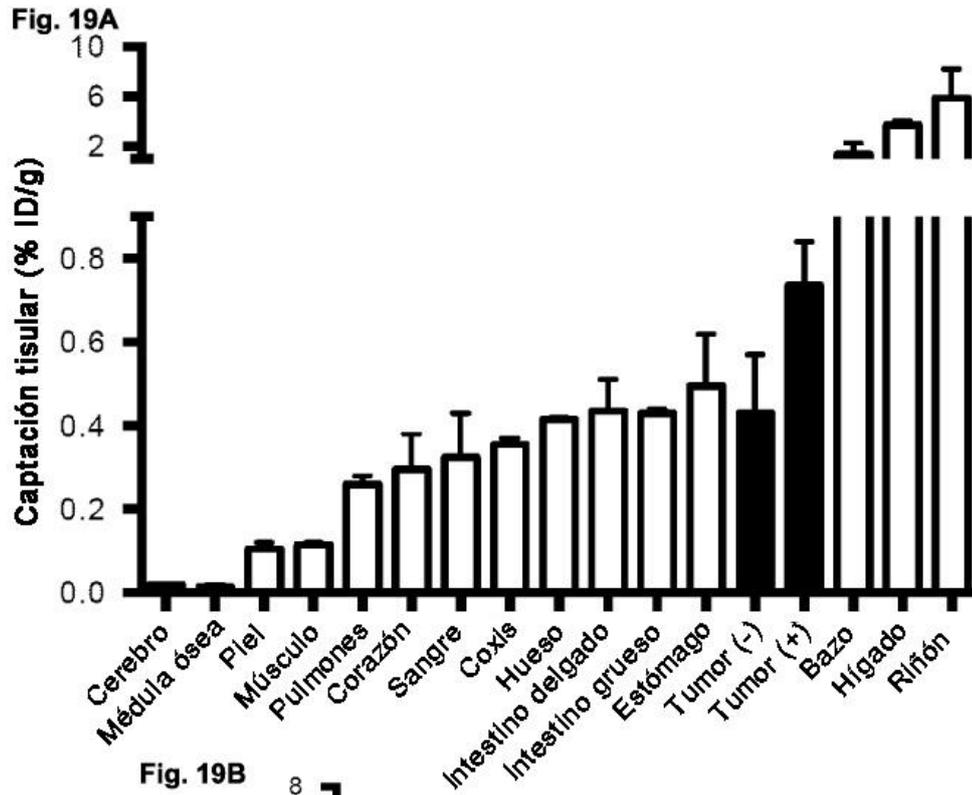


Fig. 20A

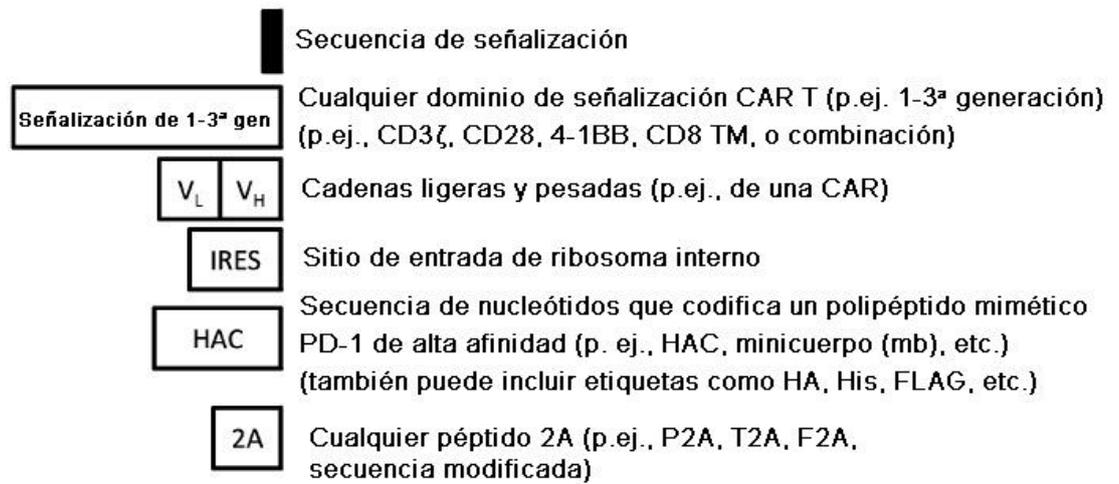


Fig. 20B

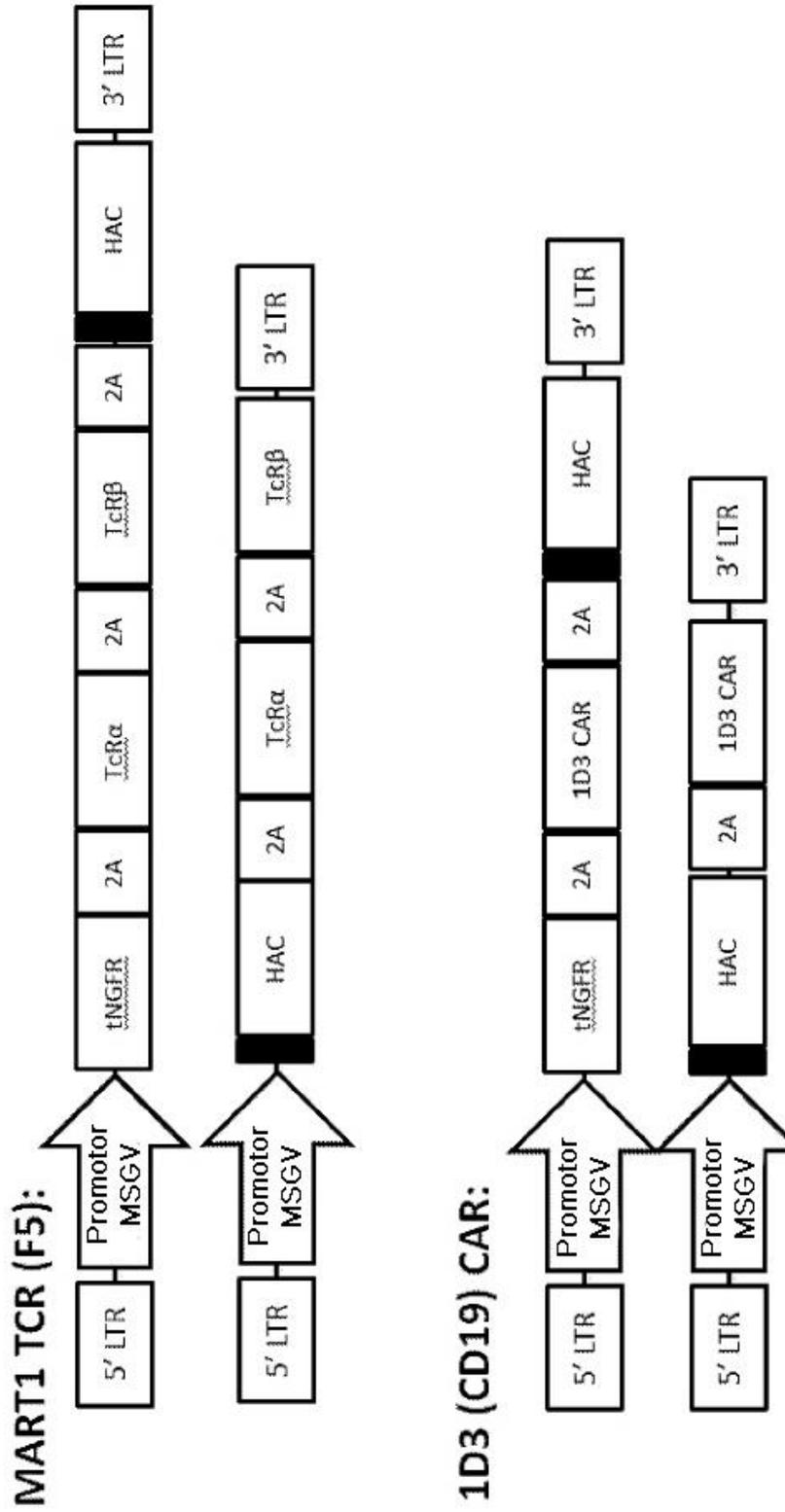
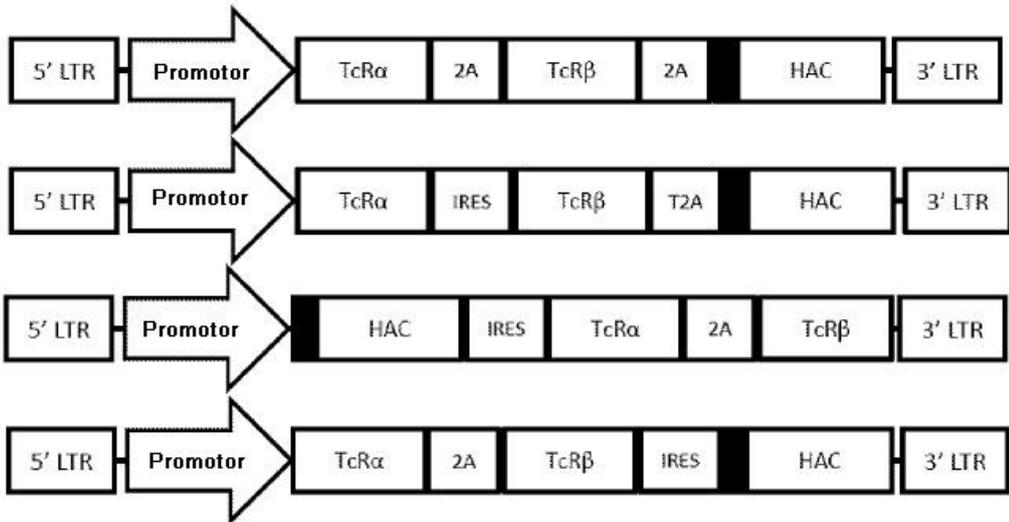


Fig. 20C

Vector promotor simple:

TCR diseñado



CAR diseñado

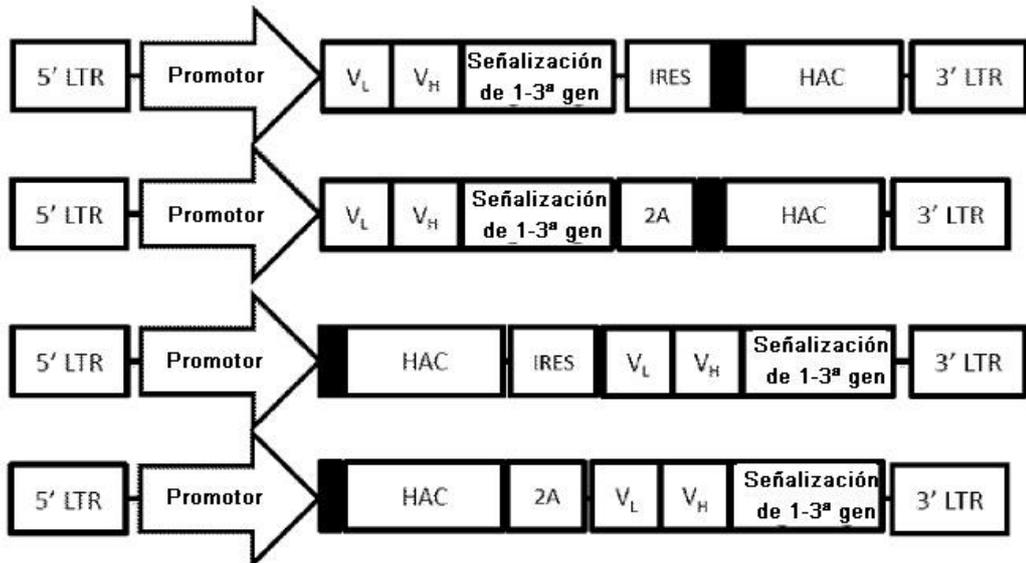
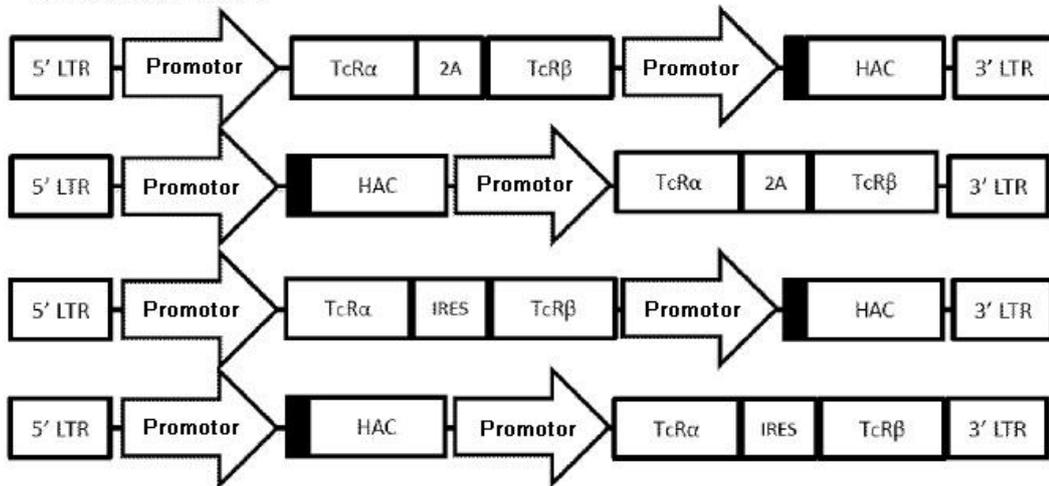


Fig. 20D
Vectores promotores separados:

TCR diseñado



CAR diseñado

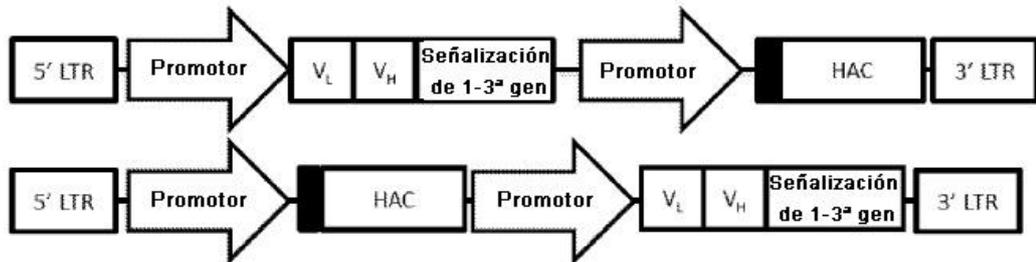
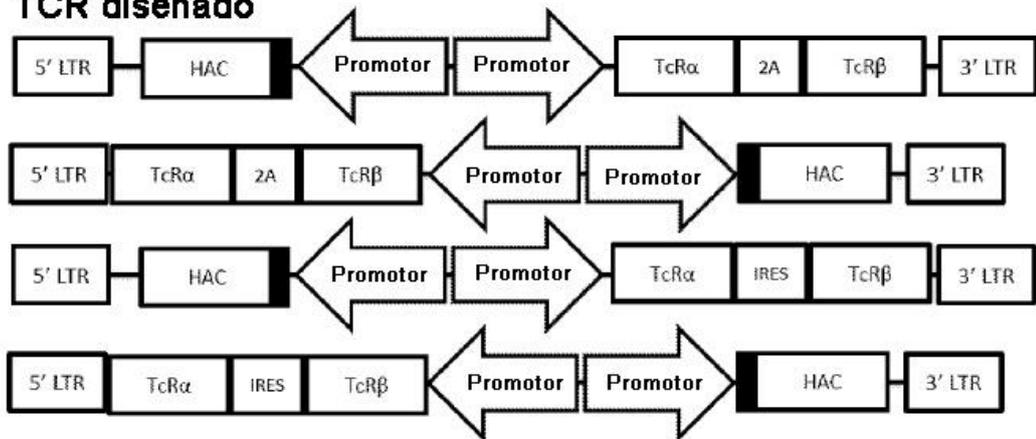


Fig. 20E

Vectores promotores separados bidireccionales:

TCR diseñado



CAR diseñado

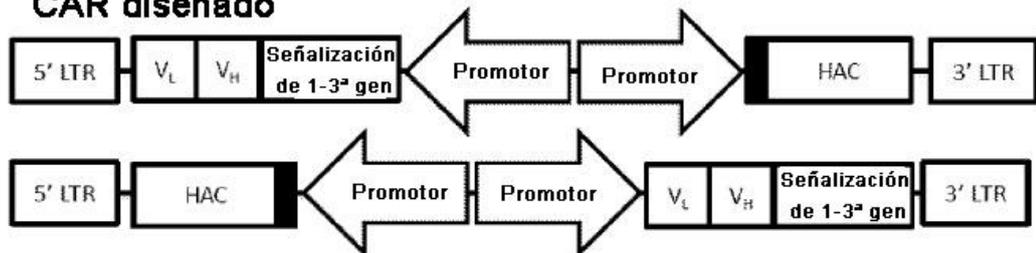


Fig. 21A

MSGV-HAC-M5

(Secuencia es SEQ ID NO:101)

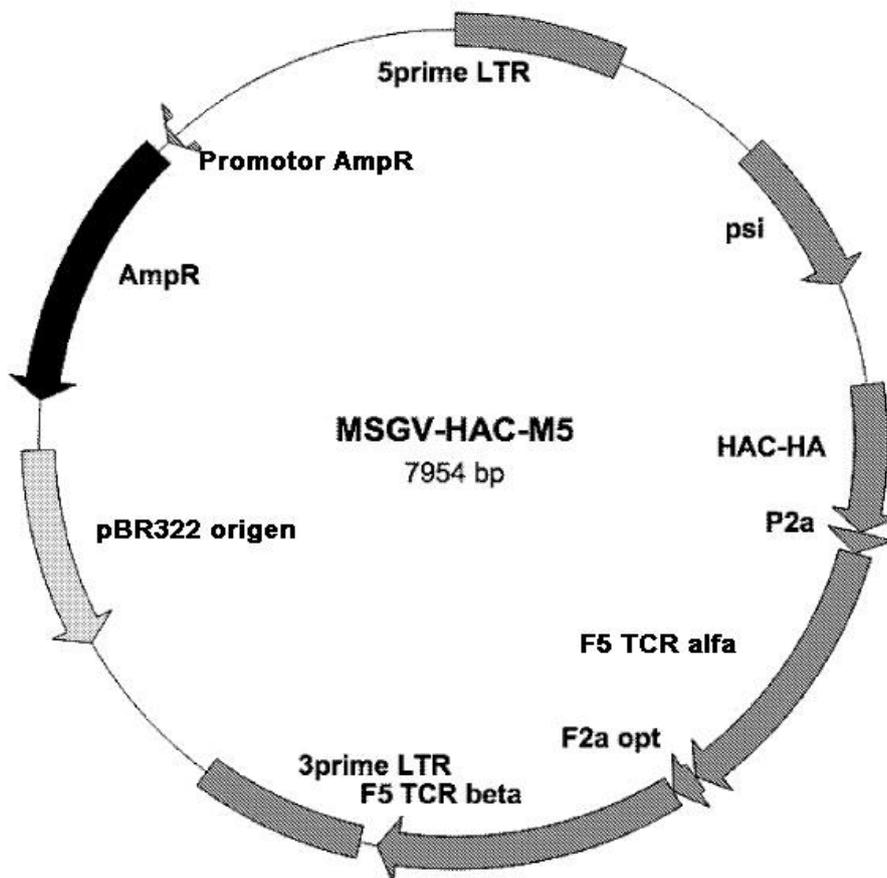


Fig. 21B

MSGV-NGFR-M5-HAC
(Secuencia es SEQ ID NO: 102)

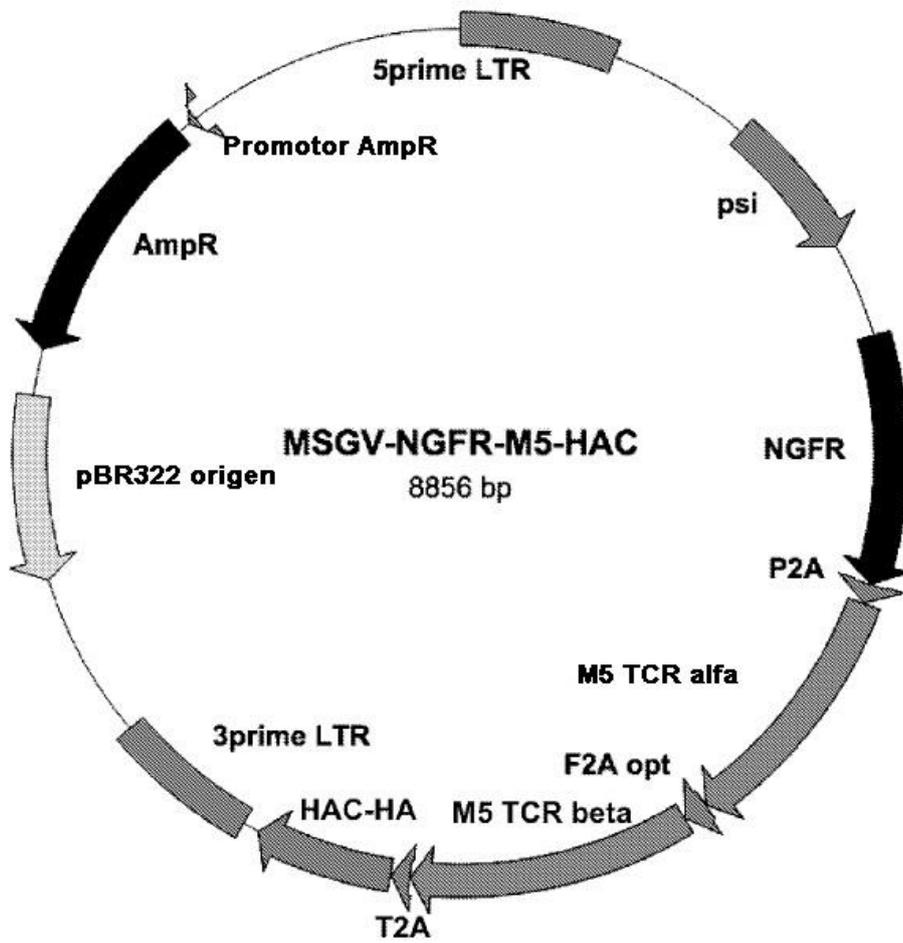


Fig. 21C

MSGV-HACmb-1D3 CAR
(Secuencia es SEQ ID NO: 103)

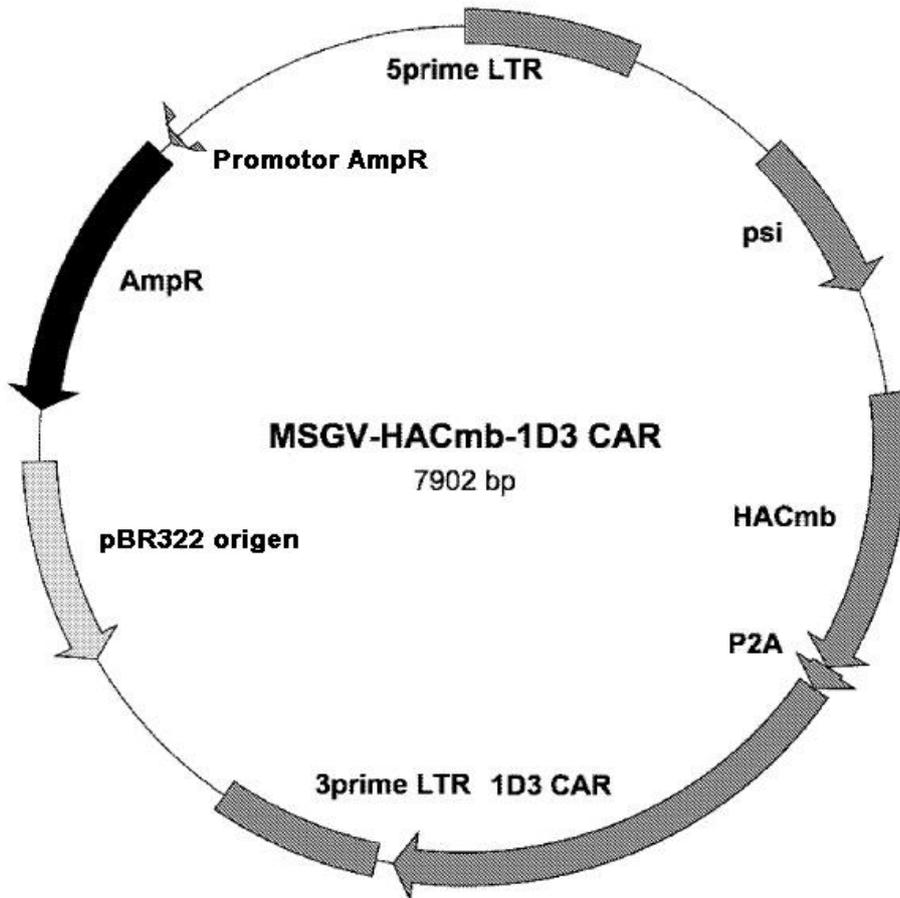


Fig. 21D

MSGV-NGFR-1D3 CAR-HACmb
(Secuencia es SEQ ID NO: 104)

